UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS
ANTI-EPITELIAIS E CÉLULAS DENDRÍTICAS
NO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA PAULA DO VALLE CHIOSSI

Ribeirão Preto

- 2001 -

Chiossi, Maria Paula do Valle

Titulação de anticorpos séricos anti-epiteliais e células dendríticas no pênfigo foliáceo endêmico. Ribeirão Preto, 2001.

172 p.; 29,7 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP, Área de Concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Ana Maria Ferreira Roselino

1. Pênfigo foliáceo, Células dendríticas, Células de Langerhans, Imunofluorescência

MARIA PAULA DO VALLE CHIOSSI

**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS
ANTI-EPITELIAIS E CÉLULAS DENDRÍTICAS
NO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
Área de Clínica Médica, para obtenção do grau de
Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Ferreira Roselino

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Silva Costa

Ribeirão Preto

- 2001 -

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Renal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 95/0551-7, e do CNPq (bolsa de Mestrado).

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Ana Maria Ferreira Roselino, pela dedicação, orientação e apoio, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado. Sua presença se fez sentir, dia a dia, disposta a ajudar com carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa, Titular do Departamento de Patologia da FMRP-USP, por ter permitido a realização desse trabalho em seu Laboratório, por seu auxílio constante na orientação das metodologias utilizadas e pelo cuidado e talento na documentação fotográfica histológica.

À biomédica Érika Pontin Delloiagono Gual, às técnicas especializadas Ana Maria Azevedo de Abreu e Marilena Herédia, do Departamento de Patologia da FMRP-USP, pela valiosa colaboração na realização das reações de imunofluorescência e imunohistoquímica.

Ao Dr. Luciano Neder, médico assistente do Departamento de Patologia da FMRP-USP, e Antônio Renato Meirelles e Silva, técnico especializado do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, pela colaboração na análise morfométrica das lâminas.

À Dr^a Mônica T. Pastorello, médica assistente do Departamento de Patologia da FMRP-USP, pelo diagnóstico histológico das lâminas.

Ao Prof. Dr. Geraldo Maia Campos, Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, pela orientação na realização do estudo estatístico.

Ao Prof. Dr. Hélio A. Carrara, Dr. Mário Eduardo Monteiro de Barros e Dr. Werther Marchesan e aos médicos assistentes e Residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e de Cirurgia Plástica do HC-FMRP-USP, pela ajuda na coleta de material do grupo controle.

Ao Prof. Dr. Jorge Cury, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Araraquara- Unesp, pela correção ortográfica e gramatical.

Ao Alex Adriano da Silva, do Setor de Informática do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela formatação desse trabalho.

Aos colegas médicos assistentes e Residentes da Divisão de Dermatologia e do Laboratório de Patologia Renal, pelo apoio.

SUMÁRIO

Lista de Siglas e Abreviaturas	
Introdução.....	1
Pênfigo Foliáceo Endêmico(PFE) ou Fogo Selvagem.....	2
Características epidemiológicas.....	3
Epidemiologia do PFE no Estado de São Paulo.....	6
PFE na região de Ribeirão Preto, Nordeste do Estado de São Paulo.....	8
Características clínicas.....	12
Características histopatológicas.....	14
Imunologia do PFE.....	14
Citocinas e dermatoses bolhosas.....	18
Imunidade celular e pênfigo foliáceo.....	20
Células de Langerhans.....	23
Células dendríticas e dermatoses bolhosas.....	28
Objetivos.....	31
Material e Métodos.....	33
Grupo de Estudo.....	34
Grupo Controle.....	49
Métodos.....	52
Imunofluorescência indireta (IFI).....	52
Estudo imunohistoquímico.....	54
Quantificação das células dendríticas.....	56
Análise estatística.....	57
Resultados.....	58
Titulação de anticorpos séricos por IFI no PFE.....	59
Quantificação das CL.....	69
Quantificação das CD dérmicas.....	85
Razão entre número de CL e CD dérmicas.....	87
Quantificação das CD no PFE: quadro clínico localizado ou generalizado.....	89
Quantificação das CD no PFE: variação com o tratamento.....	99
CL e CD no PFE e correlação com titulação de anticorpos séricos.....	113
Discussão.....	125
Titulação de anticorpos séricos por IFI no PFE.....	126
Titulação de anticorpos séricos por IFI e forma clínica no PFE.....	128
Titulação de anticorpos séricos por IFI e tratamento do PFE.....	130
Caracterização das células dendríticas (CD).....	131
Diferentes métodos de quantificação das CL.....	133
Células de Langerhans: variações regionais.....	135
Quantificação das CL e CD dérmicas na pele normal.....	138
Quantificação das CL e CD dérmicas nas dermatoses bolhosas.....	139
Células de Langerhans no PFE.....	141
Células dendríticas dérmicas no PFE.....	142
Razão entre número de CL e de CD dérmicas.....	143
Quantificação das CL e CD dérmicas no PFE: quadro clínico localizado ou ou generalizado.....	144

Quantificação das CL e CD dérmicas no PFE: variação com o tratamento.....	145
CD no PFE e correlação com titulação de anticorpos séricos.....	148
Novas perspectivas.....	149
Conclusões.....	150
Resumo.....	152
Summary.....	155
Referências Bibliográficas.....	158
Apêndice	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD- ("cluster of designation"): sistema de designação de anticorpos monoclonais que evidenciam antígenos ou moléculas de superfície de células

CD: células dendríticas

CL: células de Langerhans

DH: dermatite herpetiforme

Dg: desmogleína

ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay"): ensaio imunoenzimático

FS: fogo selvagem

HIV ("human immunodeficiency virus"): vírus da imunodeficiência humana

INF- γ : interferon gama

Ig: imunoglobulina

IL ("interleukin"): interleucina

IFD: imunofluorescência direta

IFI: imunofluorescência indireta

kD (quilodalton): unidade de peso molecular

MHC ("major histocompatibility complex"): complexo maior de histocompatibilidade

PB: penfigóide bolhoso

PF: pênfigo foliáceo

PFE: pênfigo foliáceo endêmico

PV: pênfigo vulgar

PUVA ("Psoralen plus long wave radiation UVA"): fotoquimioterapia com psoralen e radiação ultravioleta A

PBS ("phosphate buffer saline"): solução salina tamponada com fosfatos

TNF ("tumor necrosis factor"): fator de necrose tumoral

INTRODUÇÃO

Pênfigo foliáceo endêmico ou fogo selvagem

O termo *pemphigus* refere-se a um grupo de doenças que são caracterizadas pela presença de bolhas intra-epidérmicas e exulcerações em mucosas.

Nada se conhecia sobre a patogênese dos pênfigos até 1964, quando BEUTNER & JORDON demonstraram a existência de auto-anticorpos anti-epiteliais no soro de pacientes com pênfigo, utilizando técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Desde esse trabalho pioneiro, os pênfigos e outras doenças bolhosas foram renomeadas e agora são conhecidas como "doenças bolhosas auto-imunes".

A partir de 1964, os pênfigos têm sido estudados intensivamente, tornando-se um dos maiores modelos de doença mediada por auto-anticorpos. A deposição de imunoglobulina G (IgG) no espaço intercelular epidérmico é encontrada na pele perilesional de aproximadamente 100% dos pacientes com doença ativa e é um critério diagnóstico essencial, sendo que 80 a 90% dos pacientes têm IgG circulante contra a substância intercelular, demonstrada por IFI.

O pênfigo foliáceo endêmico (PFE) ou fogo selvagem (FS) é semelhante à forma não endêmica de pênfigo, que ocorre na América do Norte e Europa, descrita originalmente por Cazenave. Ambas as formas são caracterizadas clinicamente por bolhas superficiais e lesões erosivas que afetam a pele e, raramente, as mucosas. Estudos histológicos demonstram acantólise na camada subcórnea da epiderme e auto-anticorpos circulantes no soro do paciente, que reconhecem a glicoproteína desmogleína 1 (STANLEY et al., 1986). Fatores que distinguem as duas formas de pênfigo são: características epidemiológicas, incluindo a distribuição geográfica, e faixa etária acometida.

Características epidemiológicas

Uma característica marcante do FS é sua epidemiologia, com achados únicos de distribuição geográfica e etária, o que o diferencia do pênfigo foliáceo clássico, descrito por Cazenave (CASTRO & PROENÇA, 1983).

No Brasil, há mais de 15.000 casos descritos, sendo o maior número de casos nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, com aparente aumento nos Estados de Mato Grosso, Pará, Maranhão, Rondônia, Acre e Amazonas. O PFE ocorre em Estados entre 45° e 60° de longitude Oeste, e 5° e 25° de latitude Sul, em regiões com altitude entre 500 e 800m, com clima subtropical. Também há casos descritos no Paraguai, Argentina, Bolívia, Peru e Colômbia (DIAZ et al., 1989b).

O PFE predomina em adultos jovens ou crianças, que moram em áreas rurais, próximas a rios, sendo rara em centros urbanos. Não há diferença no acometimento por sexo ou raça. Há um número significativo de pacientes numa mesma família, sendo os doentes geneticamente relacionados (PROENÇA & RIBEIRO, 1976; DIAZ et al., 1989b).

Essas características do FS levaram à hipótese de que a doença seria precipitada pela exposição a um fator ambiental e, já em 1940, VIEIRA ressaltava que o inseto - borrachudo - predominava nas zonas mais atingidas pelo FS.

Estudo epidemiológico caso-controle, realizado por LOMBARDI et al., 1992, apontou o borrachudo (família *Simuliidae*) como possível agente precipitante do FS, ao mostrar que agricultores expostos a picadas de borrachudos tinham 4,7 vezes mais chances de desenvolver a doença comparados aos não expostos. Isso reforçou a hipótese

que a exposição crônica a antígenos do simulídeo poderia precipitar a formação de IgG4 em indivíduos predispostos.

HANS-FILHO et al., 1996, estudaram foco ativo com alta prevalência de FS (2,6%) na reserva indígena Terena de Limão Verde, Mato Grosso do Sul. EATON et al., 1998, mostraram que a espécie de *Simuliidae* mais freqüente nessa reserva era de *Simulium nigrimanum*, que estava ausente nas vilas vizinhas onde não havia casos de FS.

WARREN et al., 2000, estudaram a prevalência de anticorpos anti-desmogleína 1, utilizando ELISA, no soro de 60 pacientes com PFE, moradores da reserva indígena de Limão Verde, de 372 indivíduos sadios da reserva indígena e seus arredores, e de 126 indivíduos dos Estados Unidos e Japão. Os anticorpos anti-desmogleína 1 foram detectados em 98% dos doentes, em 55% dos moradores sadios de Limão Verde, em 19% dos moradores das redondezas e em 2% dos indivíduos dos Estados Unidos e Japão. Concluíram que a prevalência de anti-desmogleína 1 é alta entre sadios que moram em área endêmica de PFE e o início da doença é precedido por resposta persistente de anticorpos. Esses achados sustentam o conceito que a produção de anticorpos contra a desmogleína 1 se inicia com a exposição a um agente ambiental desconhecido.

Além dos fatores ambientais, fatores do hospedeiro também devem ter papel importante, determinando se uma pessoa exposta desenvolverá ou não a doença.

Em 1988, PETZL-ERLER & SANTAMARIA estudaram a susceptibilidade e resistência ao PFE promovidas pelo HLA, encontrando que, pelo menos 1 gene, associado ao DR1DQw1 e ao DR4DQw3, confere susceptibilidade, e pelo menos 1 gene, associado ao DR7DQw2 e DR3DQw2, confere resistência.

MORAES et al, 1991, relataram que o DRB1*0102 estava associado com susceptibilidade e DRB1*0201 com resistência ao PFE na população brasileira. No estudo realizado por CERNA et al., 1993, em 10 índios Xavantes com PFE, foi detectada frequência elevada do HLA DRB1*0404, estatisticamente significante, e DRB1*1402, não significante. Como DRB1*0102 e DRB1*0404 têm sequência idêntica na terceira região hipervariável do primeiro domínio, sugeriu-se que esse epítipo poderia estar envolvido na susceptibilidade ao PFE.

Em 1997, MORAES et al. estenderam o estudo para a população de índios Terena, no Mato Grosso do Sul. Foi encontrado predomínio dos alelos DRB1*1602, DRB1*1402, DRB1*0802, DRB1*0404 e DRB1*1406, sendo o DRB1*0404, estatisticamente significante. Assim, os autores sugeriram que a susceptibilidade ao FS não estaria ligada a um alelo HLA particular mas a um epítipo presente em todos os alelos previamente descritos, reforçando a hipótese de que a terceira região hipervariável do gene HLA-DRB1 é altamente significativa para a predisposição para a doença.

ROSELINO et al., 1998, determinaram o HLA de 23 pacientes com pênfigo (21 PF e 2 PV), procedentes do município de Batatais, SP, local de alta incidência de PF. Como grupo controle, foram utilizados soros de 448 indivíduos sadios, procedentes da mesma região geográfica. Verificaram frequência do HLA A69 significativamente aumentada nos pacientes com PF, assim como do alelo HLA DRB1*01, sendo esse alelo encontrado também em um paciente jovem com PV. Não foi confirmada a proteção atribuída ao HLA DQ2.

Epidemiologia do PFE no Estado de São Paulo

A primeira descrição de PFE no Estado de São Paulo foi feita por Paes-Leme, em 1903, com a denominação errônea de Tokelau (VIEIRA, 1942).

Em 1912, foi descrito por Luciano Gualberto um foco de PFE na cidade de Franca, durante o 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia (VIEIRA, 1940).

VIEIRA, 1942, relatou a existência de PFE no Estado de São Paulo há mais de 50 anos, conforme constatou “no caso de um doente de Batatais que contraiu a moléstia há 50 anos e este por sua vez tem recordação de casos anteriores. De moradores antigos de Franca, ouvimos que seus antepassados já conheciam o terrível fogo selvagem”.

Durante a década de 1930, houve aumento acentuado do número de casos no Estado de São Paulo, o que levou o Governo a criar um hospital para tratar doentes com PFE (VIEIRA, 1940). Até abril de 1946, 351 enfermos haviam sido atendidos no Hospital do Pênfigo, com mortalidade hospitalar de 40,7% (VIEIRA, 1948).

VIEIRA, 1940, relatou que em dois terços do Estado de São Paulo havia registro de casos de PF: zona nordeste, noroeste, oeste, sudoeste; não ocorrendo no sul, leste e litoral. No nordeste, a incidência máxima da doença ocorria na zona Mogiana, de Franca a Ribeirão Preto, estendendo-se até margear o Rio Grande, abrangendo Ituverava e Igarapava. Ressaltou que em Franca dominava o borrachudo nas zonas mais atingidas pelo FS. Nesse estudo de 350 doentes, mostrou que a doença predominava dos 15 aos 19 anos, e dos 25 aos 29 anos, em mulheres e em indivíduos de cor branca.

Em 1942, com 460 casos registrados, VIEIRA destacou Franca e Ribeirão Preto como municípios com a maior ocorrência da moléstia, além da alta incidência em quase

todos os seus municípios vizinhos. Assinalou que a doença atingia de preferência populações rurais e de nível de vida pobre e, excepcionalmente, zonas urbanas (Franca, São Carlos, Jaú e Bocaina).

Utilizando inquérito epidemiológico, realizado em 1973-74, PROENÇA, 1977, catalogou 41 casos de PFE no Estado de São Paulo, com maior acometimento de mulheres e predomínio em brancos e jovens. Concluiu que estaria havendo declínio da ocorrência de PFE no Estado, havendo total desaparecimento de focos endêmicos.

CUNHA, 1988, estudou 30 casos de PFE na área de Franco da Rocha e Mairiporã (cidades a noroeste da cidade de São Paulo), entre 1982 e 1987, caracterizando a persistência desse antigo foco endêmico, considerado como o último foco endêmico de FS no Estado de São Paulo.

Estudo retrospectivo realizado por SARTORI-BARRAVIERA & DILLON, 1997, de 63 casos de PFE atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, de 1976 a 1993, mostrou predomínio da ocorrência em jovens, da raça branca, do sexo feminino, procedentes de zona rural, além da ocorrência de casos numa mesma família; não detectou focos endêmicos.

Assim, no Estado de São Paulo, o PFE foi observado desde o início do século, alcançando alta taxa de incidência nas décadas de 1930 e 1940 (ARANHA-CAMPOS, 1942; VIEIRA, 1940; VIEIRA, 1942; VIEIRA, 1948), declinando sensivelmente nas décadas de 1960 a 1980 (PROENÇA, 1977; CUNHA, 1988; SARTORI-BARRAVIERA & DILLON, 1997).

Pode-se dizer que o declínio da frequência de PFE no Estado de São Paulo está relacionado ao avanço da tecnologia, mudanças na ecologia e mudanças nos hábitos pessoais dos indivíduos. Portanto, a exposição a fatores etiológicos potenciais, que

podem ter precipitado o PFE no passado mas não estão mais presentes, pode ter alterado a epidemiologia da doença. Apesar do crescimento exponencial da população no Estado de São Paulo nas últimas décadas, a frequência do PFE diminuiu sensivelmente (DIAZ et al., 1989b; PROENÇA & CASTRO, 1971).

PFE na região de Ribeirão Preto, Nordeste do Estado de São Paulo

(CHIOSSI & ROSELINO, *in press*).

Tendo em vista que a região de Ribeirão Preto se destaca desde a década de 1940 como importante foco endêmico de PFE, foi realizado levantamento de prontuários de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), de 1973 a 1998, para avaliar as características epidemiológicas do PFE na região. O HCFMRP-USP é um hospital de nível terciário, referência para a região Nordeste do Estado de São Paulo, assim como para o Sul de Minas Gerais.

Foram atendidos 245 casos de PFE em 26 anos, dentre 340 casos de dermatoses bolhosas auto-imunes (72,06%). A média foi de 9,42 casos novos de PFE por ano, destacando-se o ano de 1990, com atendimento de 23 casos novos, havendo predomínio de acometimento de mulheres (60,41%) em relação aos homens. A idade dos doentes variou dos 7 aos 82 anos, com maior número de casos (29,39%) ocorrendo na 2ª década de vida, seguido da 3ª (20,0%) e da 4ª décadas (18,37%). Assim, 51,43% dos casos ocorreram em menores de 29 anos, e 40,81% entre 30 e 59 anos. Em apenas 7,76% dos casos houve ocorrência em maiores de 60 anos.

Quanto à raça, 70,20% eram brancos, 20,41% pardos, 8,98% negros. Apenas 1 paciente era de cor amarela (0,41%).

A profissão predominante encontrada entre os pacientes foi de prendas domésticas entre as mulheres (67,57%) e de lavrador entre os homens (40,21%). 35% das mulheres exerciam atividades domésticas na zona rural, e 9,26% dos lavradores residiam em zona urbana. 46,93% eram procedentes de zona rural, 5,71% de zona urbana e para 47,34% dos casos não se obteve tal informação.

Treze pacientes (5,3%) relataram a ocorrência de PFE em algum familiar e 4 (1,6%) relataram-na em vizinhos.

Para a caracterização do Nordeste do Estado de São Paulo, foram consideradas as Divisões Regionais de Saúde (DIR) do Estado de São Paulo. 36,73% dos casos eram procedentes da DIR XVIII (Ribeirão Preto), 22,04% da DIR XIII (Franca), 13,47% da DIR VII (Araraquara), 8,86% da DIR IX (Barretos), 4,08% de outras DIR (São João da Boa Vista, Piracicaba, Bauru) e 20,81% de outros Estados, principalmente Minas Gerais. Na DIR de Ribeirão Preto, destaca-se o grande número de casos procedentes dos municípios de Batatais (33,33%) e de Ribeirão Preto (23,33%). O número de casos procedentes de cada município da região Nordeste de São Paulo pode ser visualizado na Figura 1.

Ressalta-se que no ano de 1990, em que foram atendidos 23 casos novos de PFE, houve maior procedência de casos de Ribeirão Preto e Batatais, coincidindo com um surto de PFE detectado em Instituição para menores, situada na zona rural de Batatais, no período de 1988 a 1990 (ROSELINO & ALMEIDA, 1995). Deve-se levar em conta que a cidade de Ribeirão Preto está localizada a 23°10'42'' latitude Sul e 47°48'24''

latitude Oeste, a uma altitude de 518m. Apresenta clima tropical, com verão chuvoso e inverno seco, com temperaturas médias de 19°C no inverno e 25°C no verão.

Esses dados mostram que os 245 casos de PFE atendidos no HC-FMRP-USP apresentam características em concordância com a literatura quanto à distribuição etária, sexo, raça, procedência de área rural. A região de Ribeirão Preto poderia ser então considerada como foco remanescente de PFE no Estado de São Paulo.

Figura 1: Distribuição de casos de PFE, de acordo com o município de procedência (região Nordeste do Estado de São Paulo), atendidos no HC-FMRP-USP, 1973 a 1998.

Características clínicas

As doenças bolhosas auto-imunes podem ser classificadas, segundo DIAZ et al., 1989a, em:

- Pênfigo Vulgar (PV)
- Pênfigo Vegetante
- Pênfigo Foliáceo Clássico (Cazenave)
- Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE) ou Fogo Selvagem (FS)
- Pênfigo Eritematoso (Senear-Usher)
- Pênfigo induzido por drogas
- Pênfigo paraneoplásico (ANHALT et al., 1990)

Essas formas clínicas diferenciam-se quanto à faixa etária, além de características do acometimento de pele e/ou mucosas e do comprometimento do estado geral.

A lesão cutânea primária no PFE caracteriza-se por vésico-bolhas superficiais, que se rompem facilmente, deixando áreas superficialmente desnudas. As lesões sempre ocorrem na região da cabeça e pescoço e depois se disseminam em direção acral. Não são observadas lesões mucosas. Em todas as formas clínicas, quando a doença está ativa, o sinal de Nikolsky é positivo (GOODMAN, 1953).

Quanto à apresentação clínica, pode ser classificada em:

1) forma localizada (frustra): as lesões estão distribuídas nas áreas seborréicas da face e tronco, geralmente são isoladas, constituídas por placas ceratóticas numulares

ou ovais, com superfície amarelo-acastanhada, enquanto que outras podem ser violáceas ou hiperpigmentadas.

2) forma generalizada: corresponde a 3 síndromes clinicamente distintas:

- forma bolhosa-esfoliativa: forma aguda e agressiva, com predomínio de bolhas e poucas lesões crônicas erosivas,
- eritrodermia esfoliativa: predomínio de erosões superficiais, com crostas e exsudato seroso,
- lesões ceratóticas placares e nodulares generalizadas.

3) forma hiperpigmentada: ocorre em pacientes que se encontram em fase evolutiva para remissão. A hiperpigmentação pode ser restrita às áreas com lesões prévias ou pode ser difusa e atingir a pele previamente não afetada.

A evolução clínica pode ser:

- Aguda: menor que 6 semanas
- Crônica: maior que 6 semanas
- Recorrente: pacientes com doença crônica que apresentam remissão parcial da doença com subsequente reativação
- Cura: pacientes com ausência de lesões cutâneas ou de achados sorológicos positivos por um período maior que 12 meses (DIAZ et al., 1989a)

O PF não é observado em crianças nascidas de mães com PF ativo (ROCHA-ALVAREZ et al., 1992), sendo descrito apenas um caso de PF neonatal com confirmação clínica por IF (WALKER et al., 1995).

Há descrição da associação de PF com infecção pelo HIV (CUNHA et al., 1995), sendo que, quando foi feito o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV, o PF, anteriormente recorrente, apresentava-se sob controle, sem medicação.

Características histopatológicas

O aspecto histológico cardinal é a presença de vesícula acantolítica intra-epidérmica subcórnea, com acantólise na camada granulosa. Nas lesões verrucosas e vegetantes são visualizadas acantólise, hiperkeratose, parakeratose e papilomatose (VIEIRA, 1940; VIEIRA, 1942; VIEIRA, 1948; LEVER, 1953).

Os achados ultra-estruturais mostram que o destacamento célula-célula (acantólise) na epiderme lesada do PFE está localizado na camada granulosa, com preservação da morfologia normal da camada basal e espinhosa (SOTTO et al., 1980).

Imunologia do PFE

Em 1968, BEUTNER et al. usaram técnicas de IF para detectar a presença de auto-anticorpos que se ligam à superfície das células escamosas no PFE, obtendo padrão indistinguível do PV, tanto por IFD como IFI.

KOULU et al., 1984, e STANLEY et al., 1986, mostraram que os auto-anticorpos dos pacientes com PF (endêmico ou não) ligam-se a uma glicoproteína do desmossomo que é diferente do antígeno reconhecido pelos auto-anticorpos do PV (uma glicoproteína de 130kD). Por "immunoblotting", demonstrou-se que os soros de PF e FS ligavam-se especificamente e intensamente a um polipeptídeo de 160kD,

identificado como desmogleína 1 (Dg1). Porém, ainda não se sabia se esses anticorpos eram patogênicos. Isto foi mostrado por ROSCOE et al., 1985, ao purificar IgG do soro dos pacientes e injetar no peritônio de camundongos BALB/c recém-nascidos, obtendo lesões cutâneas idênticas às humanas no aspecto clínico, histológico, imunológico e ultra-estrutural. A extensão da doença correlacionava-se com o título do anticorpo anti-epitelial e quando as injeções foram descontinuadas, não mais surgiram lesões novas, e as antigas cicatrizavam. Esse achado incluiu o PF no seleto grupo das doenças humanas em que há transferência passiva da doença para animais.

Os auto-anticorpos do PFE são encontrados no soro de todos os pacientes com doença ativa e seu título se correlaciona com a extensão e atividade da doença. Assim, os auto-anticorpos do FS são considerados marcadores sorológicos específicos da doença (SQUIQUERA ET AL., 1988).

AOYAMA et al., 2000, realizaram ELISA com Dg1 recombinante como antígeno em 8 soros de pacientes com PF, concluindo que esse exame pode ser ferramenta promissora na monitorização da gravidade da doença e na determinação do início da terapêutica.

Em 1988, KAWANA et al. mostraram que os auto-anticorpos do PFE fixam complemento (C1q, C₄ e C₃) de uma maneira similar aos auto-anticorpos do PV, tanto em secções de epiderme, num padrão intercelular, como em cultura de células epidérmicas, aparentemente pela via clássica.

ROCK et al, 1989, mostraram que a IgG4 é o autoanticorpo predominante e patogênico em pacientes com PFE, sendo encontrada em altos títulos em pacientes com doença ativa. A IgG4 também mostrou-se patogênica no modelo murino, com ligação à superfície dos ceratinócitos, presença no soro, e aspecto histológico típico de PFE.

Porém, não foi detectada a deposição de C_3 no modelo murino. Portanto, a ativação do complemento pode não ser necessária para a produção de acantólise experimental em camundongos e, no entanto, pode ter papel amplificador na doença humana.

ESPAÑA et al, 1997, utilizaram o modelo animal para investigar o papel do complemento e da valência da IgG na formação da bolha do PF. Em experimentos de transferência passiva, IgG, fragmentos $F(ab')_2$ e Fab foram capazes de induzir a doença bolhosa subcórnea típica em camundongos, com e sem deficiência de complemento. A atividade da doença correlacionou-se com a dose de IgG ou seus fragmentos proteolíticos injetados nos animais, sendo que nem a ativação do complemento e nem "crosslinking" do antígeno da superfície mediado por IgG foram necessários para a indução de acantólise no modelo experimental de PF. Concluíram que a acantólise subcórnea induzida pela IgG "in vivo" é um processo independente do complemento, e que a resposta patogênica se correlaciona com a dose de IgG ou fragmento de IgG injetado na pele.

O estudo do comportamento das subclasses de IgG, em relação à evolução do PFE, foi feito por SANTOS, 1996, utilizando IFI com anticorpos monoclonais no soro de 47 doentes com PFE e 31 controles sadios (12 parentes e 19 não parentes). Pôde ser observado que a IgG4 esteve presente em todas as fases evolutivas da doença, exceto na cura e a IgG1 surgiu no início da doença (< 6 meses) e na recaída. Altos títulos de IgG4 são acompanhados de maior positividade de IgG1. A IgG1 pode ter participação significativa no mecanismo imunorregulatório do PFE, podendo representar um marcador sensível para início ou reinício da atividade clínica.

Quanto à localização ultra-estrutural dos auto-anticorpos na epiderme, WOLFF & SCHREINER, 1971, mostraram que estão depositados e confinados aos espaços intercelulares da epiderme.

RIVITTI et al., 1994, estudaram a epiderme e o epitélio oral de pacientes com PFE, mostrando que todos os pacientes possuíam lesões de pele e acantólise subcórnea mas nenhum apresentava bolhas ou erosões orais, apesar da IFD ter demonstrado a presença de autoanticorpos na epiderme e no epitélio oral em todos os pacientes.

Em 1998, SHIRAKATA et al. sugeriram que a ausência do acometimento de mucosas no PF pode ser devida à baixa expressão de Dg1 na mucosa. Estudando-se a expressão de Dg1 e Dg3 na epiderme e epitélio escamoso mucoso, por IF e imunoblotting, concluíram que, embora Dg1 e Dg3 se distribuam de maneira semelhante por todo o epitélio escamoso mucoso, a Dg1 é expressa em nível muito menor que a Dg3. Esse achado fornece boa explicação para o paradoxo: embora os auto-anticorpos anti-Dg1 bloqueiem a função da Dg1 no epitélio mucoso, a Dg3 pode ser suficiente para manter a adesão célula-célula na mucosa nos pacientes com PFE. Isso parece explicar porque, apesar da expressão de Dg1 na mucosa, os pacientes de PF não apresentam acometimento do epitélio mucoso.

Citocinas e dermatoses bolhosas

Citocinas são pequenos glicopeptídeos secretados pelos linfócitos T e B, células NK, macrófagos, células de Langerhans (CL) e outros tipos celulares envolvidos na comunicação célula a célula em resposta a um estímulo específico.

As células T CD4⁺ (T helper) são classificadas como Th1, Th2 e Th0, de acordo com padrões de produção de citocinas. As células Th1 secretam interleucina (IL) 2, interferon (INF) γ e fator de necrose tumoral (TNF) β . As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, enquanto as células Th0 secretam a maioria ou todas as citocinas Th1 e Th2.

As citocinas produzidas pelas células Th1 regulam a ativação de macrófagos, aumentando a apresentação de antígenos, fagocitose, expressão do receptor Fc e produção de óxido nítrico e superóxido. As células Th1 regulam a resposta inflamatória do tipo hipersensibilidade tardia, enquanto as células Th2 estimulam a produção de mastócitos, eosinófilos e IgE. No entanto, certos antígenos, sob certas condições, não induzem padrão Th1 ou Th2 bem definido, mas sim em direção ao fenótipo Th0, produzindo padrão misto de citocinas (ROMAGNANI, 1992).

As células dendríticas liberam citocinas com capacidade de induzir diferenciação de células T, sendo a IL-12 de especial importância, por ser capaz de induzir a diferenciação de células T para o fenótipo Th1 (MACATONIA et al., 1995). Recentemente, uma nova citocina, originalmente conhecida por IFN γ -inducing factor e agora denominada IL-18, foi descrita como capaz de induzir diferenciação Th1, sendo

produzida por macrófagos ativados, ceratinócitos murinos, osteoblastos e células de Kupffer (STOLL et al., 1998).

Nos últimos anos têm sido estudados os padrões de resposta imune e de produção de citocinas nas doenças bolhosas.

No estudo das citocinas no penfigóide bolhoso (PB), INAOKI & TAKEHARA, 1998, encontraram níveis séricos elevados de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, receptor solúvel de IL-2 e CD23 solúvel. Quando comparados aos dados clínicos, os níveis séricos de IL-6 e IL-8 poderiam ser indicadores da atividade da doença. Em concordância, D'AURIA et al., 1997, encontraram níveis séricos elevados de IL-6, TNF α e IL-10 em pacientes com PB.

O estudo de GIACALONE et al., 1998, em pacientes com PB, mostrou diminuição de IL-7 e TGF β e elevação de TNF α , IL-4 e IL-10, quando compararam o fluido da bolha aos níveis séricos dessas citocinas.

A expressão de citocinas e marcadores celulares na pele perilesional de PB mostrou deposição de IL-4, IL-13 e IL-5 e aumento da ligação de eosinófilos *in vitro*, sugerindo que as citocinas Th2 são relevantes no recrutamento e adesão de eosinófilos no infiltrado dérmico (RICO et al., 1999).

Com relação ao PV, D'AURIA et al., 1997, encontraram níveis séricos elevados de IL-6 e TNF α , com correlação significativa com o número de lesões dos pacientes.

RICO et al., 1999, encontraram na pele perilesional de PV padrão misto Th1/Th2 de citocinas, incluindo a presença de IL-2, INF γ e IL-4, e ausência de IL-5 e IL-13. A presença de citocinas Th1 e Th2 na pele perilesional de pacientes com PV é consistente com estudos *in vitro*, que demonstram a produção de IL-4, IL-10 e INF γ por

linhagens celulares específicas para desmogleína 3 de linfócitos de pacientes com PV (HERTL et al., 1998).

Quanto ao estudo das citocinas no PFE, ZEOTI et al., 2000, mostraram que há diminuição de IL-4, IL-5 e INF γ e aumento de IL-10 e IL-12 no soro de pacientes com PFE, quando comparados a controles, sugerindo inibição no padrão Th1 e exacerbação do Th2 ou também a participação do padrão Th0. Não houve diferença nas concentrações de citocinas em relação às formas clínicas (localizada ou generalizada) da doença.

LIN et al, 2000, estudando clones de células T responsivos à Dg1 de pacientes com PFE, observaram que houve produção de IL-4, IL-5, IL-6 e não de IFN- γ , sugerindo que secretem um padrão de citocinas Th2, induzindo as células B em produzir IgG4, o que implica na relevância das células Th2 na patogênese do PFE.

Imunidade celular e pênfigo foliáceo

Embora seja grande o interesse no estudo da imunidade humoral nos pênfigos, existem poucos estudos sobre o envolvimento da imunidade celular, em geral ou localmente na pele, nessas dermatoses bolhosas.

BARRAVIERA et al., 1995, mostraram que nos pacientes com PFE há leucocitose, com aumento do número de segmentados e eosinófilos. Esses achados poderiam ser explicados pela presença de infecção secundária nas áreas exulceradas e pela alta prevalência de parasitose intestinal. Considerando-se os valores relativos, os pacientes apresentavam diminuição da subpopulação CD₃ e CD₄ e tendência à

diminuição de CD₈, sendo que, em valores absolutos, não houve diferença em relação aos controles, nem quanto à subpopulação de células B. Os autores concluíram que a resposta imune celular nos pacientes com PFE está preservada. Esses dados estão em concordância com os achados de GUERRA et al., 1976, que detectaram baixa porcentagem de linfócitos T e porcentagem normal de linfócitos B circulantes nos doentes.

Em 1993, ZILLIKENS et al. verificaram que células mononucleares ativadas estão presentes na pele lesada de pacientes com PFE, podendo contribuir para a patogênese da doença. Em 5 pacientes com PF, células HLA-DR⁺ e Células de Langerhans CD1⁺ estavam aumentadas na derme da lesão, quando comparadas à derme perilesional, além de aspecto semelhante ter sido observado com as células mononucleares. Esses dados sugerem que, além dos auto-anticorpos, células T ativadas e monócitos/macrófagos podem contribuir para a patogênese do pênfigo.

SANTI, 1997, estudou a participação da resposta imune mediada por células no PFE pela caracterização imunofenotípica dos elementos celulares inflamatórios e pela expressão das moléculas de adesão celular. Realizou técnica imunohistoquímica com os anticorpos: CD8, CD4, IL-2R, CD1a (células de Langerhans), ICAM-1 (CD54), LFA-1 e Pan B na pele lesada e perilesional de 20 doentes de PFE e, através de análise semi-quantitativa, encontrou no infiltrado inflamatório mononuclear a presença de subpopulações de linfócitos T, CD4 e CD8, enquanto os linfócitos B foram raramente encontrados, havendo predomínio do fenótipo CD4 tanto na pele lesada como perilesional. Os linfócitos T expressaram marcadores de ativação (HLA-DR e IL-2R) e LFA-1, sendo que a imunomarcação com HLA-DR na epiderme revelou positividade apenas de células com morfologia dendrítica e, na derme, revelou-se positiva em células

mononucleares, dendríticas e endoteliais. Todos os elementos celulares imunomarcados, com exceção dos linfócitos IL-2R e B, predominaram na pele lesada do PFE quando comparada à pele perilesional, sem diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas localizada e generalizada de PFE. A imunomarcção com o anticorpo CD1a demonstrou que a população de CL estava diminuída na epiderme lesada quando comparada à epiderme perilesional, enquanto o número de células dendríticas CD1a da derme era maior na pele lesada que na pele perilesional. Concluiu que na patogenia do PFE ocorre a participação da imunidade mediada por células T do perfil Th2 e que os queratinócitos parecem ser apenas a célula alvo da IgG4, enquanto o papel de células apresentadoras de antígeno parece ser exercido por células profissionais, as CL.

LIN et al., 2000, identificaram e caracterizaram a resposta imune de linfócitos T em pacientes com FS. Foi demonstrado que as células T desses pacientes proliferam quando estimuladas por Dg1 recombinante, evidenciando que os linfócitos T reconhecem o auto-antígeno que é alvo dos auto-anticorpos, sendo essa proliferação antígeno-específica. A análise fenotípica sugere que são células T de memória CD4+, que regulam a produção de anticorpos.

Células de Langerhans

A pele, além da sua função de barreira, também é um órgão imunologicamente ativo, possuindo elementos celulares e humorais relacionados com a resposta imune. Os constituintes celulares do sistema imune cutâneo, presentes tanto na epiderme como na derme, são os ceratinócitos, as células dendríticas apresentadoras de antígeno, os monócitos, os macrófagos, os granulócitos, os mastócitos e os linfócitos T e B. Os constituintes da resposta humoral são as imunoglobulinas, as citocinas, proteínas do complemento, as prostaglandinas e os neuropeptídeos (BOS, 1997).

Dentro do grupo das células dendríticas, que por sua vez são um subgrupo das células apresentadoras de antígeno, estão as células de Langerhans (CL). Sua função era extremamente controversa até 1977, quando foram descritos receptores de superfície para Fc, C₃ e moléculas de histocompatibilidade (MHC) classe II, ficando aparente sua conexão com o sistema imune cutâneo (STINGL et al., 1977). Essas células têm a capacidade única de induzir resposta imune primária e são importantes na rejeição de enxertos, reações de hipersensibilidade tardia e resposta de células T específicas (HOGAN & BURKS, 1995). Existem evidências atuais de que elas sejam capazes de fazer distinção entre quais antígenos serão reconhecidos e quais poderão ser descartados, determinando se haverá sensibilização ou não (BOS, 1997).

A identificação das CL pode ser feita por estudo ultra-estrutural, cujo aspecto característico é a presença dos grânulos de Birbeck, organelas com aspecto de raquete e com estria central, que parecem estar envolvidas em uma forma especializada de endocitose (TEUNISSEN, 1992). As células que possuem aspecto ultra-estrutural de

CL, mas não possuem o grânulo característico, são denominadas células indeterminadas.

Por técnicas de imunohistoquímica, as CL podem ser identificadas por possuírem a enzima adenosina-trifosfatase (ATPase), que nenhuma outra célula epidérmica contém (WOLFF, 1972), além de possuírem a proteína S-100, embora S-100 esteja presente em células dendríticas do baço e linfonodos (BREATHNACH, 1988).

Uma maneira mais sofisticada de identificação das CL é o uso de anticorpos monoclonais, que se ligam especificamente a moléculas da superfície celular (TEUNISSEN, 1992).

Em condições não patológicas, as CL são as únicas células da epiderme que expressam MHC classe II, porém, em caso de doença, os ceratinócitos também podem expressar essa molécula de superfície (AUBOCK et al., 1986).

As CL também expressam fortemente o antígeno CD1a, inicialmente definido como uma molécula de superfície de linfócitos T e B, e que parece estar envolvido na apresentação de antígenos a células T γ/δ (LAPPIN et al., 1996). ASHWORTH et al., 1988, mostraram que todas as CL expressam simultaneamente CD1a e MHC classe II. Assim, CD1a (OKT6) e HLA-D são os melhores e mais úteis marcadores para a identificação das CL (TEUNISSEN, 1992).

Quanto à sua origem, pode-se propor que as CL epidérmicas são derivadas das células CD1a+ da medula óssea que, via circulação sangüínea, chegam até a pele e migram para a epiderme. Pode-se, porém, considerar que tanto a repopulação como a

reprodução podem ocorrer simultaneamente na pele normal na manutenção da sua população (TEUNISSEN, 1992).

A distribuição das CL em adultos está restrita ao epitélio escamoso estratificado, isto é, epiderme, apêndices cutâneos, mucosa oral, esofágica, pulmonar, vaginal e epitélio cervical uterino. A maior parte da população de CL reside na epiderme ao nível suprabasal, formando uma rede com seus prolongamentos dendríticos. Constituem 2 a 8% da população celular epidérmica total (TEUNISSEN, 1992), sendo calculado que mais de 10^9 CL estão presentes na epiderme de um adulto em condições normais (BOS & KAPSENBERG, 1986). As CL podem ser consideradas como população dinâmica, que continuamente deixam a epiderme e são substituídas por seus precursores circulantes, com média de tempo na epiderme de 3 semanas (BOS & KAPSENBERG, 1986).

Células semelhantes às CL, denominadas células indeterminadas, podem ser detectadas na derme. Elas expressam CD1a e MHC classe II e podem representar precursores das CL em direção à epiderme ou seriam CL da epiderme em direção ao linfonodo regional (TEUNISSEN, 1992), mas não apresentam os grânulos de Birbeck à microscopia eletrônica.

BERMAN et al., 1983a, quantificaram as densidades das CL na pele de diferentes regiões anatômicas em adultos, encontrando densidade de aproximadamente 450 células/mm^2 , independente de sexo ou raça. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as densidades nas diferentes regiões do corpo, com exceção da planta dos pés ($60/\text{mm}^2$). Também não houve diferença entre a densidade na pele de indivíduos vivos e de cadáveres.

CHEN et al., 1985, mostraram que a pele da face e pescoço continha a maior densidade de CL, enquanto a pele do tronco, couro cabeludo, braços e pernas possuíam densidades semelhantes (aproximadamente $740/\text{mm}^2$). Mucosa bucal apresentava menor quantidade de CL do que a pele do tronco, enquanto a região sacro-coccígea, palmas e plantas apresentaram o menor número de CL. O estudo foi feito em chineses, de 18 a 60 anos, em pele sem evidência de elastose solar, obtida de cirurgia plástica, cirurgia de tumores viscerais ou dentro de 4 horas após morte acidental por trauma. Não foi encontrada diferença quanto ao sexo. Essa densidade mais elevada que no estudo de BERMAN et al., 1983a, foi explicada por ter sido estudada população mais jovem.

Vários fatores podem levar à alteração na densidade de CL na epiderme. THIERS et al., 1984, mostraram a influência da idade e da exposição crônica ao sol na população das CL, sugerindo que ambos os fatores afetam de maneira independente o número de CL e sua morfologia. Há diminuição no número de CL no idoso (>65 anos), em comparação ao grupo controle de jovens (<24 anos), sendo que esse valor é ainda menor na pele foto-exposta. Nos jovens, o número de CL é maior que no idoso, não havendo diferença entre a pele foto-exposta ou coberta.

O efeito da idade e da radiação ultravioleta na população de CL, mostrado por GILCHREST et al., 1982, foi que as CL são mais numerosas em jovens (23 anos em média) que nos idosos (média: 69 anos), além dos idosos apresentarem resposta mais lenta à radiação ultravioleta. Por outro lado, a idade não influenciou o número de CL na mucosa oral, porém o tabagismo levou a aumento localizado na densidade de CL na língua e mucosa labial (CRUCHLEY et al., 1994).

PUVAterapia para psoríase provocou perda dos processos dendríticos das CL numa primeira exposição, e redução no número de CL após 7 sessões (FRIEDMANN,

1981). Injeções intradérmicas de interferon α -2 β levam à diminuição no número de CL (TONG & TUCKER, 1993). Por outro lado, o uso de etretinato, por 4 a 5 semanas, não provocou alteração no número de CL na psoríase vulgar, pustulose palmo-plantar e líquen plano hipertrófico (KOULU & JANSÉN, 1982).

Também já foi demonstrado que o uso de corticosteróides tópicos leva à diminuição no número de CL e na sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos (ASHWORTH et al., 1988). A aplicação tópica de corticosteróides em pele humana, pele de ratos e pele de porcos levou à redução seletiva na expressão de receptores de superfície das CL, com reversão após suspensão da exposição à medicação (BERMAN et al, 1983b). A administração sistêmica de dexametasona e prednisolona a camundongos levou à diminuição das CL epidérmicas, além de perda dos grânulos de Birbeck à análise ultra-estrutural (BERNATECK et al., 1996). BELSITO et al., 1982, também demonstraram que a administração tópica e sistêmica de glicocorticóides potentes em cobaias resultou em diminuição da densidade das CL, relacionada com a concentração e potência vasoconstritora da droga usada.

Outros fatores que podem levar à redução no número de CL são: a imunossupressão em pacientes transplantados renais e os tratamentos dialíticos. GALVÃO et al., 1998, mostraram que há redução estatisticamente significativa das células CD1a+ na pele fotoprotegida de receptores de transplantes renais, sem relação com o tempo de imunossupressão. METTANG et al., 1993, realizaram contagem de CL em pacientes em CAPD (diálise peritoneal ambulatorial contínua) e em hemodiálise. Observaram que é significativamente menor quando comparada a controles e pacientes urêmicos antes de iniciar o tratamento dialítico. Não foi encontrada correlação

estatisticamente significativa entre a duração da diálise e a contagem das CL. Como foi feita a contagem de células por mm², variações da espessura da epiderme não influenciaram os resultados obtidos.

NANDWANI et al., 1996, mostraram que não há declínio na densidade de CL à medida que ocorre progressão da infecção pelo HIV, nem quando comparada a controles HIV-negativos, porém esses dados não permitem avaliar a função ou cinética das CL.

Células dendríticas e dermatoses bolhosas

Estudo do infiltrado mononuclear nas doenças bolhosas, por técnicas de imunoperoxidase com anticorpos monoclonais, mostrou que, na pele perilesional de PB e PV, há maior número de CL em relação à pele normal e à dermatite herpetiforme (DH), o que favorece o papel da imunidade celular na formação da bolha e apresentação do antígeno nessas dermatoses. Na DH, poucas CL estão presentes na epiderme e ausentes na derme, sugerindo que a apresentação e processamento de antígeno não ocorrem na pele, mas é o intestino o local dessas atividades (NESTOR et al., 1987).

Quando é feita a comparação entre a pele sã e a pele lesada de pacientes com DH, usando anticorpos monoclonais e técnica de avidina-biotina-peroxidase, observa-se que células dendríticas CD1a⁺ estão presentes na derme, em associação com linfócitos T, em 9 dos 10 pacientes estudados, mas estão ausentes na derme da pele normal. Na epiderme, não houve diferença entre o número de CL na pele normal e lesada (GARIOCH et al., 1994).

O estudo da imunidade celular no PV mostrou que a intensidade da resposta celular e a proporção de células CD1+ são maiores na pele perilesional do que na pele não lesada. No entanto, não há correlação significativa entre a proporção de células CD1+ e os marcadores de ativação dos linfócitos, sugerindo que outros fatores estão envolvidos na ativação local dos linfócitos (MASHKILLEYSON et al., 1989).

PICUT et al., 1987, estudaram a expressão dos antígenos HLA-DR e OKT6 nos ceratinócitos e nas células dendríticas no PV. Observaram que a pele lesada dos pacientes com PV se caracteriza por alteração na distribuição das células dendríticas epidérmicas, com aumento na subpopulação HLA-DR+/ OKT6-, implicando as células dendríticas na patogênese da doença. A expressão aberrante de HLA-DR pelos ceratinócitos está presente na pele normal e lesada dos pacientes, sugerindo que seja evento primário, com papel imunorregulatório na iniciação ou perpetuação da doença auto-imune. Porém, a expressão de HLA-DR pelos ceratinócitos não é específica para o pênfigo, ocorrendo em outras dermatoses.

O estudo das CL no PB por EMTESTAM et al., 1987, mostrou que há número significativamente maior de células OKT6+ na epiderme lesada quando comparada à pele normal e à pele normal de controles. Também foi observada redistribuição das CL em direção à membrana basal na pele lesada. Essa redistribuição pode ser explicada pela presença de complemento e de imunoglobulinas na membrana basal, uma vez que as CL possuem receptores para ambos, mas também pode ser evento primário, com as CL envolvidas na detecção e processamento de antígeno(s) localizado(s) na zona da membrana basal.

SANTI, 1997, pela caracterização imunofenotípica no PFE, descrita anteriormente, usou o anticorpo monoclonal CD1a para marcar células dendríticas,

sendo evidenciadas células dendríticas epidérmicas, com dendritos confluentes, formando malha por entre os queratinócitos epidérmicos e, mais frequentemente, agrupadas ou esparsas, com corpo celular em negro e prolongamentos dendríticos pouco evidentes. Na derme, apresentavam-se fusiformes ou bipolares ao redor dos vasos e na adventícia dos anexos cutâneos. Demonstrou que a população de CL estava diminuída na epiderme lesada quando comparada à epiderme perilesional, e que o número de células dendríticas CD1a da derme era maior na pele lesada. Não foi observada diferença na população de células dendríticas CD1a epidérmicas ou dérmicas nas formas clínicas localizada ou generalizada do FS. A diminuição da população de células dendríticas epidérmicas CD1a na pele lesada dos doentes com PFE foi explicada pela sua possível migração para a derme, onde foram encontradas em maior número que na pele perilesional. A imunomarcagem da epiderme com HLA-DR revelou positividade apenas de células com morfologia dendrítica. Na derme, as células mononucleares, dendríticas e endoteliais expressaram HLA-DR. Concluiu que o papel de células apresentadoras de antígeno parece ser exercido por células profissionais, as CL.

OBJETIVOS

A fisiopatologia do pênfigo foliáceo, doença endêmica na região Nordeste do Estado de São Paulo, não está totalmente esclarecida. Considerando-se que há aumento de IL-12 no PFE e que as células dendríticas, produtoras de IL-12, têm a função de apresentação de antígenos, tivemos por objetivos:

- 1- Quantificar as CD na pele de pacientes com PFE, por estudo morfométrico.
- 2- Correlacionar o número de CD à forma clínica do PFE.
- 3- Correlacionar o número de CD ao título de anticorpos séricos no PFE.

MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES

Grupos de estudo (n=22)

Foram incluídos no estudo 22 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de PFE, com a doença em atividade (sinal de Nikolsky positivo). Os doentes foram provenientes do Ambulatório de Dermatoses Auto-Imunes do HC-FMRP-USP e foram incluídos no estudo após consentimento (aprovado pela Comissão de Ética do HC-FMRP-USP, Processo HCRP nº 1336/99). Não foram incluídos pacientes em tratamento com anticoagulantes orais ou gestantes. Participaram do estudo pacientes em primeiro atendimento ou em seguimento ambulatorial. Os critérios de inclusão estabelecidos foram: diagnóstico clínico (Figuras 2 a 4) e histopatológico (Figuras 5 a 8), definidos por DIAZ et al., 1989a.

A amostra de pacientes com PFE foi composta por 12 (54,5%) homens e 10 (45,5%) mulheres, com proporção sexo masculino/feminino 1,2/1; idade média de 41,2 anos. Dezoito (81,8%) eram brancos, 3 (13,6%) pardos e 1 (4,5%) negro, em concordância com os dados epidemiológicos dos pacientes com PFE na região de Ribeirão Preto (CHIOSSI & ROSELINO, *in press*). Quanto à forma clínica, 13 apresentavam a forma localizada e 9, a forma generalizada, conforme classificação proposta por DIAZ et al., 1989a. Quanto à procedência, 15 pacientes eram da região Nordeste do Estado de São Paulo, enquanto 15 eram moradores ou trabalhadores de zona rural. Onze pacientes estavam em tratamento com prednisona, em doses de 5 a 60 mg/dia, associada a difosfato de cloroquina, 250mg/dia, em 4 pacientes. O tempo de

doença até a biopsia e coleta de sangue variou de 2 meses a 25 anos (Apêndice, Tabelas 1 a 4).

O grupo de estudo incluiu 9 pacientes que possuíam soro e biopsia apenas da pele lesada, sendo que o intervalo entre a coleta de ambos foi de até 35 dias. O soro esteve congelado a -70°C por período de 1 mês a 6 anos até a realização da IFI. A biopsia, incluída em parafina, encontrava-se arquivada no Departamento de Patologia do HC-FMRP-USP e foi utilizada após autorização. Esse grupo de pacientes foi nomeado "grupo retrospectivo" (Apêndice, Tabelas 1 e 3).

Treze pacientes do grupo de estudo, atendidos no período de novembro de 1998 a junho de 1999, possuíam soro e biopsia de pele lesada e normal. A coleta de 5 a 10ml de sangue periférico e as biopsias de pele foram realizadas na mesma data. A biopsia, utilizando "punch" de 4mm, após anestesia local com lidocaína 2% com vasoconstrictor, foi realizada em dois locais: pele lesada e pele normal não adjacente à pele lesada, em área não exposta ao sol (tronco ou raiz de membros inferiores). Esses pacientes foram identificados como "grupo prospectivo" (Apêndice, Tabelas 2 e 4).

Optou-se pela escolha de pele não adjacente para não se encontrar alterações da própria doença e a utilização de pele de área coberta justificou-se pela redução das células dendríticas em áreas foto-expostas, como foi evidenciado por THIERS et al., 1984.

As amostras de pele de pacientes com PFE foram comparadas às de indivíduos controles, sem qualquer dermatose, segundo idade e sexo (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos pacientes com PFE e controles, segundo dados demográficos

		Pênfigo	Controles	Total	Fisher
Sexo	M	12	5	17	n.s.
	F	10	15	25	n.s.
Média da idade em anos (ΔS)		41,3 (21,2)	43,0 (14,6)		n.s.
Cor da pele	B	18	12	30	n.s.
	P	3	6	9	n.s.
	N	1	2	3	n.s.
Total		22	20	42	

F: feminino, M: masculino, B: branca, P: parda; N: negra
n.s., não significante, $p > 0,05$

Figura 2 (A e B): Paciente de 66 anos (de número 19), procedente da zona rural de Capitinga (MG), aposentado, quadro clínico generalizado, 6 meses de evolução.

Figura 2 (C e D): Paciente de 64 anos (de número 18), procedente da zona rural de Franca (SP), lavrador, quadro clínico generalizado, 12 anos de evolução.

Figura 3 (A e B): Paciente de 9 anos (de número 6), procedente da zona rural de Buritizal (SP), estudante, quadro clínico generalizado, 2 meses de evolução.

Figura 3 (C e D): Paciente de 18 anos (de número 22), procedente da zona rural de Cajuru (SP), lavrador, quadro clínico localizado, 3 meses de evolução.

Figura 4 (A a D): paciente de 10 anos de idade (de número 2), procedente de Batatais, quadro clínico generalizado.

Figura 5: Pele normal, grupo controle (HE, x400).

Figura 6: Biopsia de pênfigo foliáceo: perda das pontes intercelulares na camada granulosa resultando em acantólise (HE, x400).

Figura 7: Biopsia de pênfigo foliáceo (paciente de 26 anos, masculino, branco, quadro clínico localizado, 10 anos de evolução): bolha subcórnea e acantólise presente na base e no teto da bolha (HE; A: x100; B: x400).

Figura 8: Biopsia de pênfigo foliáceo (paciente de 39 anos, masculino, branco, quadro clínico generalizado, 11 anos de evolução): bolha subcórnea e acantólise (HE; A: x100; B: x400).

Grupo controle (n=20)

O grupo controle constituiu-se de pele normal obtida da região torácica anterior de cadáveres e de indivíduos normais submetidos à cirurgia plástica (mastoplastia).

O primeiro grupo, obtido entre abril e maio de 1999 no Serviço de Verificação de Óbitos – Interior e HC-FMRP-USP, consistiu de 8 indivíduos, com idade variando entre 28 e 76 anos (média: 52,1; desvio padrão: 16,6), 5 homens e 3 mulheres, 5 brancos, 2 pardos, 1 negro (Tabela 2). O tempo entre o óbito e a coleta de pele foi de 3 horas, em média (Apêndice, Tabela 5).

O segundo grupo foi constituído por 12 mulheres, com idade variando entre 21 e 49 anos (média: 36,8; desvio padrão: 9,5), 7 brancas, 4 pardas, 1 negra (Tabela 3).

No total, foram obtidos 20 fragmentos de pele normal para o grupo controle, de indivíduos com idade média de 43,0 anos (desvio: 14,6 anos), 5 (25%) homens, 15 (75%) mulheres, com proporção homens/mulheres 1/3, 12 (60%) brancos, 6 (30%) pardos e 2 (10%) negros (Tabela 1).

O teste de Fisher, aplicado para os dados epidemiológicos das duas amostras tomadas, pacientes com PFE e controles, não foi significativo, com $p > 0,05$, comprovando ter características de estudo caso-controle. Porém, aplicando-se o teste t de Student para os valores de idade, houve significância ($p < 0,05$) entre o grupo controle de cirurgia plástica e cadáver. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as idades dos pacientes e dos cadáveres ou entre as idades dos pacientes e dos indivíduos submetidos à mastoplastia.

Tabela 2. Dados gerais do grupo controle – cadáver

Identificação	Idade (anos)	Sexo	Cor	<i>Causa mortis</i>
PNC-1	59	M	N	septicemia/ pneumonia bilateral/ abscesso pulmonar à direita/ prótese aorto-femural trombosada
PNC-2	73	M	P	choque cardiogênico/ cardiopatia dilatada
PNC-3	76	F	B	tamponamento cardíaco/ infarto agudo do miocárdio roto/ aterosclerose coronariana/ cardiopatia hipertensiva
PNC-4	45	M	P	broncopneumonia bilateral/ esteatose hepática
PNC-5	53	F	B	hemorragia digestiva alta/ insuficiência hepática/ hepatopatia a esclarecer
PNC-6	38	M	B	pneumonia bilateral/ cirrose hepática alcoólica/ alcoolismo crônico
PNC-7	45	F	B	carcinoma de colo uterino operado
PNC-8	28	M	B	hemorragia digestiva alta/ úlceras gástricas agudas/ neurocisticercose

F: feminino, M: masculino, B: branca, P: parda; N: negra, PNC: pele normal de cadáver

Tabela 3. Dados gerais do grupo controle - cirurgia plástica

Identificação	Idade (anos)	Sexo	Cor
PN 1	25	F	N
PN 2	21	F	B
PN 3	28	F	B
PN 4	39	F	P
PN 5	28	F	B
PN 6	42	F	B
PN 7	49	F	B
PN 8	34	F	B
PN 9	46	F	P
PN 10	46	F	N
PN 11	46	F	P
PN 12	38	F	P

F: feminino, B: branca, P: parda; N: negra, PN: pele normal

MÉTODOS

Imunofluorescência indireta

Para a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), utilizou-se soro de pacientes com PFE em atividade (sinal de Nikolsky positivo), colhido de veia periférica e armazenado a -70°C por um período de 1 mês a 6 anos até a realização da reação.

Como substrato, foi utilizado fragmento de pele humana normal de abdome, obtida de “sobra” de cirurgia plástica (abdominoplastia), conforme padronizado por MATIS et al., 1987, e FRIEDMAN et al., 1989.

Como solução tampão, foi utilizado o tampão PBS, 10mM, pH=7,4. Em 6 casos, foi realizada simultaneamente IFI utilizando o tampão tris-acetato-cálcio, tanto para a diluição do soro do paciente, da anti-IgG humana (anticorpo secundário), como para as lavagens, a fim de se comparar os resultados, haja vista a descrição de que o cálcio aumenta a sensibilidade da IFI (MATIS et al., 1987).

Passos da técnica de IFI

O fragmento de pele utilizado como substrato foi incluído em “tissue teck” (Tissue Freezing Medium, Leica Reichert & Jung Products, Germany), congelado e armazenado em nitrogênio líquido, a -256°C, até sua utilização.

Cortes de 5μ foram obtidos em criostato, a -20°C, e montados em lâmina previamente coberta com Poly-L-Lysine Hydrobromide (Sigma Chemical Co., USA) para

melhor aderência. Foram utilizados imediatamente após sua obtenção ou armazenados a -20°C por período de até 48 horas.

Os soros dos pacientes foram diluídos em PBS, em titulações crescentes de 1:2 até 1:32768 e utilizados imediatamente após as diluições.

Os cortes foram incubados com soro do paciente nas diferentes diluições, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após enxágüe com PBS, foram incubados com anti-IgG humana conjugada à fluoresceína (anti-human IgG-FITC, Birmingham, UK), na diluição de 1:20, por 30 minutos. Após enxágüe com PBS, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada.

Em todos os casos, foram realizadas, simultaneamente com o soro do paciente, lâminas com incubação com soro humano normal e anti-IgG (controle negativo), além de lâminas apenas com anti-IgG para controle da fluorescência inespecífica.

A leitura foi feita imediatamente após a montagem das lâminas, em microscópio de fluorescência, em objetiva com aumento de 40 vezes. Esta foi feita por 2 observadores e, nos casos em que houve discrepância entre as leituras (até uma diluição), foi considerada a menor diluição.

Estudo imunohistoquímico

Para a identificação das CD, optou-se pela utilização do anticorpo monoclonal OKT6 obtido de camundongo (anti-CD1a, Immunotech, USA), por ser mais sensível que Ia (HLA-DR) na definição da população de CL e células indeterminadas, além de ser mais específico, pois uma variedade de células inflamatórias reage com o anticorpo anti-Ia em algumas doenças (HARRIST et al., 1983). O OKT6 também é superior ao S-100 na identificação das CL na epiderme, em termos do número de células positivas encontradas (MODLIN et al., 1984).

Na técnica imunohistoquímica da avidina-biotina-peroxidase, descrita por HSU et al., 1981, além do anticorpo monoclonal OKT6, foi utilizado como anticorpo secundário a IgG de coelho anti-camundongo biotinilada (Dako A/S, Denmark) e o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (StreptABComplex/ HRP, Dako A/S, Denmark).

Cortes de 5 μ de material incluído em parafina foram desparafinizados em xilol, hidratados em bateria de álcool, submetidos a bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 30 Volumes em metanol e recuperação antigênica em panela de pressão. A seguir, foram incubados com leite em pó 3% por 30 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas e incubados com o anticorpo primário por 2 horas. Foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário por 35 minutos, lavados em PBS e incubados com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase por 35 minutos. Finalmente, foram revelados com diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos e contracolorados com hematoxilina de Mayer, e montados em entellan para exame em microscópio de luz convencional.

Em todos os casos, foi feito simultaneamente controle negativo, excluindo-se a incubação com o anticorpo primário.

Método de imunohistoquímica

- 1) cortes parafinados de 5µm em lâmina com poli-l-lisina, mantidos na estufa durante a noite (“overnight”);
- 2) desparafinação em 3 xilóis, 2 álcoois absolutos, 2 álcoois 90°, 1 álcool 70°, água destilada, por 2 minutos cada;
- 3) bloqueio da peroxidase endógena, por 15 minutos, em solução de 10 ml de água oxigenada 30 Volumes (Merck) em 140 ml de metanol;
- 4) lavagem em água destilada;
- 5) recuperação antigênica em panela de pressão, com tampão citrato, pH=6,0, por 1min30s (contados a partir do início da fervura);
- 6) lavagem em água corrente;
- 7) bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó Molico® 3% (12g de leite em pó em 400ml de PBS), por 30 minutos;
- 8) Incubação com o anticorpo primário por 2 horas (anticorpo monoclonal OKT6);
- 9) Lavagem em PBS (2 trocas) por 10 minutos;
- 10) Incubação com anticorpo secundário, por 35 minutos;
- 11) Lavagem em PBS (2 trocas) por 10 minutos;
- 12) Incubação com complexo Streptoavidina-biotina-peroxidase (ABC) por 35 minutos, diluição 1:100;

- 13) Lavagem em PBS (2 trocas) por 10 minutos;
- 14) Revelação com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos no escuro (5mg DAB + 10 ml PBS + 120µl de água oxigenada 30V);
- 15) Lavagem em água destilada;
- 16) Contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 15 segundos;
- 17) Lavagem em água corrente;
- 18) Desidratação em bateria de álcool, diafanização e montagem com entellan (Mikroskopie Entellan Resin Solution, Merck).

Quantificação das Células Dendríticas

Para a quantificação das CD, optou-se pela utilização de análise morfométrica para obtenção do número de CL por mm² de epiderme, mm de epiderme (camada córnea) e mm de membrana basal, e número de CD dérmicas por mm de membrana basal. As CD foram contadas por microscopia óptica, com objetiva de aumento de 40 vezes, sendo consideradas positivas as células que apresentavam a coloração específica e presença de núcleos e prolongamentos dendríticos na epiderme. Não foram contadas as CL presentes nos folículos pilosos, devido à sua maior densidade nesses locais (DE JONG et al., 1986).

As dimensões epidérmicas foram obtidas por análise morfométrica, utilizando-se uma vídeo-câmera acoplada a um microscópio de luz, com objetiva com aumento de 10 vezes. A imagem obtida no monitor de vídeo foi conectada a um analisador de imagens automático (KS300 Kontron Imaging System, Kontron Elektronik). Foram medidas: área

epidérmica, extensão da membrana basal e extensão da superfície epidérmica (camada córnea).

Análise Estatística*

Para análise estatística, foram usados testes não paramétricos e para os dados clínicos-demográficos, foi aplicado o teste exato de Fisher e t de Student. Na avaliação dos resultados de IFI e quantificação de CD, foram usados os testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Wilcoxon e, na avaliação da correlação entre títulos de IFI e quantificação de células, foi utilizado o teste de Pearson.

* GMC Basic Software, versão 8.0, "software" criado para pesquisa biológica pelo Prof. Dr. Geraldo Maia Campos, Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP.

RESULTADOS

Titulação de anticorpos séricos por IFI no PFE

As Figuras 9 a 12 mostram a fluorescência intercelular na epiderme de pacientes com PFE, à IFI.

A Tabela 4 mostra a distribuição dos títulos de auto-anticorpos (anti-IgG) por técnica de IFI nos grupos retrospectivo e prospectivo. No grupo retrospectivo, a titulação variou de 1:512 a 1:8192, enquanto no prospectivo, de 1:512 a 1:16.384, não sendo estatisticamente significante ($p>0,05$, teste de Mann-Whitney). Isso permitiu que os dois grupos fossem considerados como um grupo único para a análise das outras variáveis.

Quando os títulos de IFI foram analisados quanto à apresentação clínica dos pacientes, observou-se que os pacientes com a forma localizada apresentavam títulos de anticorpos séricos menores, comparados aos de forma generalizada, sendo esses valores estatisticamente significantes, com $p<0,01$ (Tabela 5).

Dentre os 22 pacientes estudados, metade não estava em tratamento no momento da coleta do sangue para IFI. O restante encontrava-se em tratamento e foram agrupados em um único grupo, independentemente do tempo ou tipo de tratamento. Não foi observada diferença estatisticamente significante em relação aos títulos de anticorpos séricos em vigência ou não de tratamento (Tabela 6). Foram considerados sem tratamento os pacientes que estavam há 30 dias ou mais sem usar nenhuma medicação.

Figura 9: Imunofluorescência indireta, controle negativo: pele humana normal incubada com soro humano normal (1ª fase) e posteriormente com anti-IgG humana (2ª fase), (x160).

Figura 10: Imunofluorescência indireta: pele humana normal incubada com soro de paciente com pênfigo foliáceo na diluição 1:128 (1ª fase) e posteriormente com anti-IgG humana (2ª fase), mostrando fluorescência com padrão intercelular (x160).

Figura 11: Imunofluorescência indireta: pele humana normal incubada com soro de paciente com pênfigo foliáceo na diluição 1:1024 (1ª fase) e posteriormente com anti-IgG humana (2ª fase), mostrando fluorescência com padrão intercelular (x400).

Figura 12: Imunofluorescência indireta: pele humana normal incubada com soro de paciente com pênfigo foliáceo na diluição 1:128 (1ª fase) e posteriormente com anti-IgG humana (2ª fase), mostrando fluorescência com padrão intercelular (x400).

Tabela 4: Titulação de auto-anticorpos séricos (anti-IgG), por imunofluorescência indireta, em pacientes com pênfigo foliáceo endêmico, segundo o grupo de estudo (retrospectivo e prospectivo)

Grupo retrospectivo (n = 9)	Grupo prospectivo (n = 13)
1: 2048	1: 8192
1: 8192	1: 2048
1: 1024	1: 512
1: 512	1: 512
1: 512	1: 1024
1: 4096	1: 16384
1: 4096	1: 512
1: 1024	1: 1024
1: 2048	1: 512
	1: 16384
	1: 1024
	1: 2048
	1: 2048
Mediana	
1: 2048	1: 1024
Teste de Mann-Whitney: não significante, $p > 0,05$	

Tabela 5: Titulação de auto-anticorpos séricos (anti-IgG), por imunofluorescência indireta, em pacientes com pênfigo foliáceo endêmico, segundo forma clínica (localizada e generalizada)

Localizada* (n =13)	Generalizada ^Δ (n = 9)
1: 2048	1: 8192
1: 1024	1: 4096
1: 512	1: 4096
1:512	1: 1024
1: 2048	1: 2048
1:512	1: 8192
1:512	1: 16384
1: 1024	1:512
1:512	1: 16384
1: 1024	
1: 1024	
1: 2048	
1: 2048	
Mediana	
1: 1024	1: 4096
Teste de Mann-Whitney: * ^Δ p < 0,01	

Tabela 6: Titulação de auto-anticorpos séricos (anti-IgG), por imunofluorescência indireta, em pacientes com pênfigo foliáceo endêmico, segundo vigência ou não de tratamento

Sim (n=11)	Não (n=11)
1: 8192	1: 2048
1:512	1: 1024
1: 2048	1:512
1: 8192	1: 4096
1: 1024	1: 4096
1: 16384	1: 1024
1:512	1: 2048
1: 1024	1:512
1:512	1:512
1: 1024	1: 16384
1: 2048	1: 2048
Mediana	
1:1024	1:2048

Teste de Mann-Whitney: não significante, $p>0,05$

Os pacientes foram subdivididos em quatro grupos pois havia pacientes com as formas localizada e generalizada que estavam ou não em tratamento e foi feita análise estatística com o teste de Kruskal-Wallis (Tabela 7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com a forma localizada, com e sem tratamento, nem entre o grupo com a forma generalizada, com e sem tratamento. Porém, ao se comparar os grupos sem tratamento (localizado versus generalizado) e grupos com tratamento (localizado versus generalizado), obtiveram-se valores estatisticamente significantes, com $p < 0,05$, em concordância com o resultado obtido na Tabela 5.

Tabela 7: Titulação de auto-anticorpos séricos (anti-IgG), por imunofluorescência indireta, em pacientes com PFE, segundo a forma clínica e vigência de tratamento

Localizada Tratamento		Generalizada Tratamento	
com* (n = 6)	sem● (n = 7)	com◆ (n = 5)	sem♣ (n = 4)
1:512	1: 2048	1: 8192	1: 4096
1:512	1: 1024	1: 2048	1: 4096
1: 1024	1:512	1: 8192	1: 1024
1: 1024	1: 2048	1: 16384	1: 16384
1: 1024	1:512	1:512	
1: 2048	1:512		
	1: 2048		
Mediana			
1:1024	1:1024	1:8192	1:4096

Teste de Kruskall-Wallis: *,◆: $p < 0,05$; ●, ♣: $p < 0,05$

Quantificação das Células de Langerhans

As figuras 13 a 18 mostram biopsias de pele normal e de lesão de pacientes com PFE, visualizando-se células dendríticas imunomarcadas pelo anticorpo monoclonal CD1a.

O grupo controle constituiu-se de pele normal obtida da região torácica anterior de cadáveres e de indivíduos normais submetidos à cirurgia plástica (mastoplastia). Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$), tanto no número de CL por área (CL/mm^2), como por superfície (membrana basal e camada córnea), Tabela 8, o que não permitiu que fossem agrupados como uma única população para a análise dos resultados.

Figura 13: Imunoperoxidase método ABC: biopsia de pele normal (grupo controle), mostrando células dendríticas imunomarcadas pelo anticorpo monoclonal CD1a (A: x100; B: x400).

Figura 14: Imunoperoxidase método ABC: biopsia de pele lesada (A) e pele normal (B) de paciente com pênfigo foliáceo, mostrando células dendríticas imunomarcadas pelo anticorpo monoclonal CD1a (x400).

Figura 15: Imunoperoxidase método ABC: biopsia de pele lesada de paciente com pênfigo foliáceo, mostrando células dendríticas imunomarcadas pelo anticorpo monoclonal CD1a (x400).

Figura 16: Imunoperoxidase método ABC: biopsia de pele lesada de paciente com pênfigo foliáceo, mostrando células dendríticas imunomarcadas pelo anticorpo monoclonal CD1a (x400).

Figura 17: Imunoperoxidase método ABC: biopsia de pele lesada de paciente com pênfigo foliáceo (base da bolha), mostrando células dendríticas imunomarcadas pelo anticorpo monoclonal CD1a (x400).

Figura 18: Imunoperoxidase método ABC: biopsia de pele normal (grupo controle), controle negativo da reação de imuno-histoquímica suprimindo-se a incubação com o anticorpo monoclonal CD1a (x400).

Tabela 8: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea: comparação entre pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea	
	Cirurgia Plástica ^Δ	Cadáver*	Cirurgia Plástica ^Δ	Cadáver*	Cirurgia Plástica ^Δ	Cadáver*
1	66,50	58,85	4,03	3,37	3,79	3,92
2	170,70	35,45	11,21	1,69	12,12	1,61
3	76,85	16,00	6,05	0,81	7,87	0,82
4	74,25	66,10	5,01	3,59	4,54	3,58
5	168,75	74,60	13,27	3,40	12,89	3,23
6	67,80	32,70	4,17	1,59	3,99	1,57
7	70,45	116,60	4,89	6,32	4,79	6,81
8	80,60	19,50	4,75	0,94	4,30	1,09
9	40,40		2,44		2,79	
10	48,20		2,86		3,21	
11	178,30		10,83		12,52	
12	6,50		0,41		0,39	
Mediana	72,35	47,15	4,53	2,53	4,42	2,42

Teste de Mann-Whitney: ^Δ, * p<0,05

Observa-se na Tabela 9 que o número de CL de pele lesada de pacientes com pênfigo foi semelhante ao do grupo controle oriundo de cirurgia plástica, que foi maior que o do grupo cadáver. Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, somente foi significativa a medida de CL/mm camada córnea, quando se comparou pele lesada de paciente (3,55 CL/mm camada córnea) e pele de cadáver (2,42 CL/mm camada córnea).

Tabela 9: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea em biópsias de cirurgia plástica, de cadáver e de pele lesada de pacientes com PFE

	mm ²			mm membrana basal			mm camada córnea		
	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (lesada)	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (lesada)	Cirurgia Plástica	Cadáver*	Paciente (lesada) ^Δ
1	66,50	58,85	136,20	4,03	3,37	5,85	3,79	3,92	5,79
2	170,70	35,45	3,85	11,21	1,68	0,30	12,12	1,61	0,44
3	76,85	16,00	58,85	6,05	0,81	4,26	7,87	0,82	5,42
4	74,25	66,10	0	5,01	3,59	0	4,54	3,58	0
5	168,75	74,60	230,95	13,27	3,40	14,97	12,89	3,23	16,89
6	67,80	32,70	106,15	4,17	1,59	10,07	3,99	1,57	12,65
7	70,45	116,60	22,00	4,89	6,32	1,65	4,79	6,81	2,52
8	80,60	19,50	42,10	4,75	0,94	3,30	4,30	1,09	4,74
9	40,40		93,70	2,44		10,87	2,79		14,96
10	48,20		73,95	2,86		5,72	3,21		7,77
11	178,30		20,15	10,83		1,67	12,52		2,54
12	6,50		10,60	0,41		0,85	0,39		0,93
13			24,60			1,33			1,33
14			109,65			5,59			9,31
15			49,40			5,49			6,64
16			87,60			3,02			6,39
17			186,70			9,18			10,26
18			84,50			4,51			5,82
19			53,55			5,87			11,11
20			135,40			8,62			9,54
21			61,50			6,92			10,77
22			12,90			0,92			1,18
Mediana	72,35	47,15	60,18	4,53	2,53	5,00	4,42	2,42	3,55

Teste de Kruskal-Wallis, *, ^Δ: p<0,05

Nos 13 pacientes que possuíam biopsias cutâneas tanto de pele normal como de lesão de pênfigo, foi realizado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Inicialmente, não se levou em conta se os pacientes estavam ou não em tratamento ou qual a forma clínica que apresentavam. O número de CL foi estatisticamente significativo quando feita a quantificação de CL/mm² de epiderme ($p<0,01$) e de CL/mm de camada córnea ($p<0,05$), porém não foi significativo para a medida de CL/mm de membrana basal (Tabela 10).

Tabela 10: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea em biópsias de pele normal e pele lesada de pacientes com PFE

Paciente	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea	
	Normal*	Lesada*	Normal [♦]	Lesada [♦]	Normal ^o	Lesada ^o
10	64,25	73,95	4,11	5,72	4,88	7,77
11	23,25	20,15	1,70	1,67	1,85	2,54
12	1,30	10,60	0,10	0,85	0,11	0,93
13	28,45	24,60	2,50	1,33	3,56	1,33
14	14,60	109,65	0,95	5,59	1,24	9,31
15	7,25	49,40	0,44	5,49	0,41	6,64
16	28,40	87,60	1,95	3,02	2,72	6,39
17	121,45	186,70	6,86	9,18	7,77	10,26
18	64,10	84,50	4,67	4,51	6,51	5,82
19	60,75	53,55	6,93	5,87	11,12	11,11
20	144,15	135,40	9,53	8,62	9,13	9,54
21	37,40	61,50	2,61	6,92	2,87	10,77
22	4,55	12,90	0,37	0,92	0,55	1,18
Mediana	28,45	61,50	2,50	5,49	2,87	6,64

Teste de Wilcoxon: * p<0,01, [♦] n.s., não significante, ^o p<0,05

Ao se comparar a pele normal de pênfigo à pele dos grupos controles (plástica de mama e cadáveres), Tabela 11, houve significância estatística quando se considerou o número de CL/mm² de epiderme, sendo o número de CL/mm² de pele normal de paciente com pênfigo (28,45) menor do que de cirurgia plástica (72,35), mas semelhante ao de cadáver (47,15).

Tabela 11: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea em biopsias de cirurgia plástica, de cadáver e pele normal de pacientes com PFE

	CL/mm ²			CL/mm de membrana basal			CL/mm de camada córnea		
	Cirurgia Plástica*	Cadáver	Paciente (normal) ^Δ	Cirurgia Plástica*	Cadáver ^Δ	Paciente (normal)	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (normal)
1	66,50	58,85		4,03	3,37		3,79	3,92	
2	170,70	35,45		11,21	1,68		12,12	1,61	
3	76,85	16,00		6,05	0,81		7,87	0,82	
4	74,25	66,10		5,01	3,59		4,54	3,58	
5	168,75	74,60		13,27	3,40		12,89	3,23	
6	67,80	32,70		4,17	1,59		3,99	1,57	
7	70,45	116,60		4,89	6,32		4,79	6,81	
8	80,60	19,50		4,75	0,94		4,30	1,09	
9	40,40			2,44			2,79		
10	48,20		64,25	2,86		4,11	3,21		4,88
11	178,30		23,25	10,83		1,70	12,52		1,85
12	6,50		1,30	0,41		0,10	0,39		0,11
13			28,45			2,50			3,56
14			14,60			0,95			1,24
15			7,25			0,44			0,41
16			28,40			1,95			2,72
17			121,45			6,86			7,77
18			64,10			4,67			6,51
19			60,75			6,93			11,12
20			144,15			9,53			9,13
21			37,40			2,61			2,87
22			4,55			0,37			0,55
Mediana	72,35	47,15	28,45	4,53	2,53	2,50	4,42	2,42	2,87

Teste de Kruskal-Wallis: ^Δ* p<0,05

Quantificação das células dendríticas (CD) dérmicas

Com relação às CD dérmicas, quantificadas em relação à extensão de membrana basal (Tabela 12), as CD na pele normal do PFE só estavam em menor número (0,04) quando comparadas às da pele de cirurgia plástica (0,48). Foram comparadas a pele normal de cirurgia plástica, pele normal de cadáver e pele normal de PFE.

Quando se compararam as CD na derme, estas estavam em maior número (0,98/mm membrana basal) na lesão de PF do que na pele normal de cadáver (0,13/mm membrana basal).

A comparação entre o número de CD dérmicas na pele lesada e normal de pacientes com PFE (teste de Wilcoxon), mostrou-se estatisticamente significativa, com $p < 0,01$. Não foi considerado se o paciente estava ou não em tratamento e qual o quadro clínico no momento da biopsia.

O resumo do estudo estatístico da quantificação das CL e CD dérmicas nos diferentes grupos estudados estão demonstrados nas Tabelas 7 a 9 do Apêndice.

Tabela 12: Número de CD dérmicas/ mm de membrana basal: comparação entre pele normal e de lesão de pacientes com PFE, pele normal de cadáver e de cirurgia plástica

	Pele normal			Lesão
	Cirurgia Plástica*	Cadáver ^Δ	Paciente ^o	Paciente [♦]
1	0,62	0,09		2,92
2	3,49	0,44		1,33
3	0,40	0,41		0,80
4	1,44	0,27		0
5	1,40	0,13		0,52
6	0,10	0,13		1,01
7	0,43	0,09		3,44
8	0,53	0,06		0,54
9	0,33			1,11
10	0,36		0,61	1,27
11	2,08		0	0
12	0,14		0,05	1,64
13			0	0
14			0	0,61
15			0	1,47
16			0,32	1,22
17			0,11	0
18			0,25	0,28
19			0,44	2,85
20			0	0,86
21			0	1,10
22			0,04	0,05
Mediana	0,48	0,13	0,04	0,98

Teste de Kruskal-Wallis: *, ^Δ p<0,05; *, ^o p<0,001; ^Δ, [♦] p<0,05

Teste de Wilcoxon: ^o, [♦] p<0,01

Razão entre número de CL e CD dérmicas

Para melhor avaliação da quantidade de CD na derme, realizou-se a divisão do número de CL pelo número de CD dérmicas, ambas contadas utilizando-se a mesma unidade de medida (mm de membrana basal). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as razões número de CL/ número de CD dérmicas dos dois grupos controles. Portanto, constituiu-se um único grupo controle. A razão número de CL/ número de CD dérmicas de pele lesada no PFE resultou estatisticamente menor quando comparada às dos grupos cadáver e controle total, $p < 0,05$ (Tabela 13).

Tabela 13: Razão número de CL/ CD dérmicas (mm de membrana basal) na pele de pacientes com pênfigo foliáceo (pele lesada e pele normal) e grupos controles (cirurgia plástica e cadáver)

Nº da biopsia	Grupo controle*		Pênfigo foliáceo	
	Cirurgia plástica	Cadáver*	Pele normal	Pele lesada ^Φ
1	6,50	37,44		2,00
2	3,21	3,84		0,23
3	15,13	1,98		5,33
4	3,48	13,30		Ind
5	9,48	26,15		28,79
6	41,70	12,23		9,97
7	11,37	70,22		0,48
8	8,96	15,67		6,11
9	7,39			9,79
10	7,94		6,74	4,50
11	5,21		Ind	Ind
12	2,93		2,00	0,52
13			Ind	Ind
14			Ind	9,16
15			Ind	3,73
16			6,09	2,48
17			62,36	Ind
18			18,68	16,11
19			15,75	2,06
20			Ind	10,02
21			Ind	6,29
22			9,25	18,40
Mediana	7,67	14,49	9,25	5,72

Teste de Kruskal – Wallis, *,^Φ: p<0,05

Ind.: Indeterminado (denominador =0)

Quantificação das CL e CD no PFE: quadro clínico localizado ou generalizado

A comparação da quantificação das CL/mm² na pele normal de cirurgia plástica, na de cadáver, na de pacientes com quadro clínico localizado e generalizado (Tabela 14) mostrou que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas com relação ao número de CL/mm² entre a pele de cirurgia plástica e pele normal de pacientes com quadro localizado, sendo menor no paciente com PFE do que na pele normal oriunda de cirurgia plástica.

Também houve significância estatística no número de CL/mm de membrana basal, ao se comparar a pele normal de cirurgia plástica, a pele normal de cadáver e a de paciente com lesões localizadas. Não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações do número de CL/mm de camada córnea.

A quantificação de CD dérmicas/mm de membrana basal (Tabela 15) mostrou diferenças estatisticamente significantes ao se comparar pele normal de cirurgia plástica, de cadáver e de pacientes com quadro localizado e generalizado, sendo menor no paciente com quadro localizado, seguido da pele de cadáver, da de paciente com quadro generalizado e da pele normal de cirurgia plástica.

Tabela 14: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal, CL/mm de camada córnea: pele normal de pacientes com PFE (forma localizada e generalizada), pele normal de cirurgia plástica e cadáver

	CL/mm ²				CL/mm membrana basal				CL/mm camada córnea			
	Cirurgia plástica*	Cadáver	Paciente (localizada) *	Paciente (generalizada)	Cirurgia Plástica*	Cadáver *	Paciente (localizada) *	Paciente (generalizada)	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (localizada)	Paciente (generalizada)
1	66,50	58,85	23,25	64,25	4,03	3,37	1,70	4,11	3,79	3,92	1,85	4,88
2	170,70	35,45	1,30	7,25	11,21	1,68	0,10	0,44	12,12	1,61	0,11	0,41
3	76,85	16,00	28,45	64,10	6,05	0,81	2,50	4,67	7,87	0,82	3,56	6,51
4	74,25	66,1	14,6	60,75	5,01	3,59	0,95	6,93	4,54	3,58	1,24	11,12
5	168,75	74,60	28,40		13,27	3,40	1,95		12,89	3,23	2,72	
6	67,80	32,70	121,45		4,17	1,59	6,86		3,99	1,57	7,77	
6	70,45	116,60	144,15		4,89	6,32	9,53		4,79	6,81	9,13	
8	80,60	19,50	37,40		4,75	0,94	2,61		4,30	1,09	2,87	
9	40,40		4,55		2,44		0,37		2,79		0,55	
10	48,20				2,86				3,21			
11	178,30				10,83				12,52			
12	6,50				0,41				0,39			
Mediana	72,35	47,15	28,40	64,18	4,82	2,53	1,95	4,39	4,42	2,40	2,72	5,70

Teste de Kruskal-Wallis: *, * p<0,05

Tabela 15: Número de CD dérmicas/mm membrana basal na pele normal de pacientes com PFE (forma localizada e generalizada), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CD dérmicas/mm membrana basal			
	Cirurgia Plástica*	Cadáver [♦]	Paciente	
			Localizada ⁺	generalizada ^θ
1	0,62	0,09	0	0,61
2	3,49	0,44	0,05	0
3	0,40	0,41	0	0,25
4	1,44	0,27	0	0,44
5	1,40	0,13	0,32	
6	0,10	0,13	0,11	
7	0,43	0,09	0	
8	0,53	0,06	0	
9	0,33		0,04	
10	0,36			
11	2,08			
12	0,14			
Mediana	0,48	0,13	0	0,35

Teste de Kruskal-Wallis: *,[♦]: p<0,01; *,⁺: p<0,001; [♦],⁺: p<0,05; ⁺,^θ: p<0,01

Quando se comparou a pele lesada de paciente, tanto da forma localizada como generalizada, com a pele normal de cirurgia plástica e de cadáver (Tabela 16), não se observaram resultados estatisticamente significantes na quantificação de CL, tanto quando se usa como medida a área da epiderme, como a extensão de membrana basal. Quando a medida é de CL/mm de camada córnea, as CL na pele lesada de PFE estavam em número maior (6,64) do que as de cadáver (2,40).

A quantificação das CD dérmicas por mm de membrana basal (Tabela 17) mostrou que a pele lesada de pacientes possui número de CD maior que a pele normal dos grupos controles e foi estatisticamente significante a diferença entre a pele lesada dos pacientes com quadro clínico localizado e generalizado.

Tabela 16: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea na pele lesada de pacientes com PFE (formas localizada e generalizada), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CL/mm ²				CL/mm membrana basal				CL/mm camada córnea			
	cirurgia plástica	cadáver	Paciente (localizada)	Paciente (generalizada)	Cirurgia plástica	Cadáver	Paciente (localizada)	Paciente (generalizada)	Cirurgia Plástica	Cadáver*	Paciente (localizada)	Paciente (generalizada) ^Δ
1	66,50	58,85	136,20	3,85	4,03	3,37	5,85	0,30	3,79	3,92	5,79	0,44
2	170,70	35,45	58,85	106,15	11,21	1,68	4,26	10,07	12,12	1,61	5,42	12,65
3	76,85	16,00	0	22,0	6,05	0,81	0	1,65	7,87	0,82	0	2,52
4	74,25	66,10	230,95	42,10	5,01	3,59	14,97	3,30	4,54	3,58	16,89	4,74
5	168,75	74,60	20,15	93,70	13,27	3,40	1,67	10,87	12,89	3,23	2,54	14,96
6	67,80	32,70	10,60	73,95	4,17	1,59	0,85	5,72	3,99	1,57	0,93	7,77
7	70,45	116,60	24,60	49,40	4,89	6,32	1,33	5,49	4,79	6,81	1,33	6,64
8	80,60	19,50	109,65	84,50	4,75	0,94	5,59	4,50	4,30	1,09	9,31	5,82
9	40,40		87,60	53,55	2,44		3,02	5,87	2,79		6,39	11,11
10	48,20		186,70		2,86		9,18		3,21		10,26	
11	178,3		135,40		10,83		8,62		12,52		9,54	
12	6,50		61,50		0,41		6,92		0,39		10,77	
13			12,90				0,92				1,18	
Mediana	72,35	47,15	61,50	53,55	4,82	2,53	4,26	5,49	4,42	2,40	5,79	6,64

Teste de Kruskal-Wallis: *,^Δ p<0,05

Tabela 17: Número de CD dérmicas/mm membrana basal na pele lesada de pacientes com PFE (forma localizada e generalizada), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

CD dérmicas/mm de membrana basal				
	Cirurgia Plástica*	Cadáver [♦]	Paciente	
			Localizada ⁺	Generalizada ⁰
	0,62	0,09	2,92	1,33
	3,49	0,44	0,80	1,01
	0,40	0,40	0	3,44
	1,44	0,27	0,52	0,54
	1,40	0,13	0	1,11
	0,10	0,13	1,64	1,27
	0,43	0,09	0	1,47
	0,53	0,06	0,61	0,28
	0,33		1,22	2,85
	0,36		0	
	2,08		0,86	
	0,14		1,10	
			0,05	
Mediana	0,48	0,13	0,61	1,27

Teste de Kruskal-Wallis: *, [♦]: p<0,05; [♦], ⁰: p<0,01; ⁺, ⁰: p<0,05

No grupo de pacientes com o quadro clínico localizado, usando o teste de Wilcoxon para duas amostras pareadas (Tabela 18), houve diferença estatisticamente significativa entre a pele normal e a pele lesada, na quantificação de CL/mm² de epiderme, CL/mm de camada basal, CL/mm de camada córnea e de CD dérmicas/mm de membrana basal, com número significativamente maior de CL e CD na pele lesada quando comparada à pele normal dos pacientes com a forma localizada de PFE.

Tabela 18: CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal, CL/mm de camada córnea e CD dérmicas/mm de membrana basal: comparação entre pele normal e pele lesada de pacientes com forma localizada de PFE (n = 9)

Paciente	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea		CD dérmicas/mm membrana basal	
	normal *	lesada ^Δ	normal*	lesada ^Δ	normal *	lesada ^Δ	normal*	lesada ^Δ
11	23,25	20,15	1,70	1,67	1,85	2,54	0	0
12	1,30	10,60	0,10	0,85	0,11	0,93	0,05	1,64
13	28,45	24,6	2,50	1,33	3,56	1,33	0	0
14	14,60	109,65	0,95	5,59	1,24	9,31	0	0,61
16	28,40	87,60	1,95	3,02	2,72	6,39	0,32	1,22
17	121,45	186,70	6,86	9,18	7,77	10,26	0,11	0
20	144,15	135,40	9,53	8,62	9,13	9,54	0	0,86
21	37,40	61,50	2,61	6,92	2,87	10,77	0	1,10
22	4,55	12,90	0,37	0,92	0,55	1,18	0,04	0,05
Mediana	28,40	61,50	1,95	3,02	2,72	6,39	0	0,61

Teste de Wilcoxon: *,^Δ p<0,05

No grupo de pacientes com o quadro clínico generalizado, usando o teste de Wilcoxon para duas amostras pareadas (Tabela 19), não houve diferença estatisticamente significativa entre a pele normal e a pele lesada, na quantificação de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea. Quanto às CD dérmicas, houve um número significativamente maior de CD na pele lesada que na pele normal dos pacientes na forma generalizada de PFE, com $p < 0,05$.

Tabela 19: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal, CL/mm de camada córnea e CD dérmicas/mm de membrana basal: comparação entre pele normal e pele lesada de pacientes com forma generalizada de PFE (n = 4)

Paciente	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea		CD dérmicas/mm membrana basal	
	normal	lesada	normal	lesada	normal	lesada	normal*	lesada ^Δ
10	64,25	73,95	4,11	5,72	4,88	7,77	0,61	1,27
15	7,25	49,40	0,44	5,49	0,41	6,64	0	1,47
18	64,10	84,50	4,67	4,51	6,51	5,82	0,25	0,28
19	60,75	53,55	6,93	5,87	11,12	11,11	0,44	2,85
Mediana	62,43	63,75	4,39	5,61	5,70	7,21	0,35	1,37

Teste de Wilcoxon: *,^Δ p<0,05

Quantificação das CL e CD no PFE: variação com o tratamento

A comparação da quantificação das CL na pele de cirurgia plástica, de cadáver, de pacientes com e sem tratamento (Tabela 20) mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre o número de CL/mm² da pele de cirurgia plástica (72,35) e pele normal de pacientes sem tratamento (23,25). Também houve significância estatística no número de CL/mm de membrana basal, ao se comparar pele de cirurgia plástica (4,82) com pele de cadáver (2,53), e de cirurgia plástica com pacientes sem tratamento (1,70). Não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações do número de CL/mm de camada córnea.

A quantificação de CD dérmicas/mm de membrana basal (Tabela 21) mostrou que há menor número de CD na pele normal de paciente (sem diferença entre os grupos com e sem tratamento) que na pele de cirurgia plástica.

Tabela 20: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea na pele normal de pacientes com PFE (com e sem tratamento), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CL/mm ²				CL/mm membrana basal				CL/mm camada córnea			
	Cirurgia Plástica*	Cadáver	Paciente (com trat)	Paciente (sem trat) ^Δ	Cirurgia Plástica [♦]	Cadáver ^O	Paciente (com trat)	Paciente (sem trat) ^O	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (com trat)	Paciente (sem trat)
1	66,50	58,85	64,25	23,25	4,03	3,37	4,11	1,70	3,79	3,92	4,88	1,85
2	170,70	35,45	14,60	1,30	11,2	1,68	0,95	0,10	12,12	1,61	1,24	0,11
3	76,85	16,00	7,25	28,45	6,05	0,81	0,44	2,50	7,87	0,82	0,41	3,56
4	74,25	66,10	28,40	60,75	5,01	3,59	1,95	6,93	4,54	3,58	2,72	11,12
5	168,75	74,60	121,45	4,55	13,27	3,40	6,86	0,37	12,90	3,23	7,77	0,55
6	67,80	32,70	64,10		4,17	1,59	4,67		3,99	1,57	6,51	
7	70,45	116,6	144,15		4,89	6,32	9,53		4,79	6,81	9,13	
8	80,60	19,50	37,40		4,75	0,94	2,60		4,30	1,0	2,87	
9	40,40				2,44				2,79			
10	48,20				2,86				3,21			
11	178,30				10,83				12,52			
12	6,50				0,41				0,39			
Mediana	72, 35	47,15	50,75	23,25	4,82	2,53	3,36	1,70	4,42	2,40	3,88	1,85

Teste de Kruskal-Wallis: *, ^Δ p<0,01, [♦], ^O p<0,05

Tabela 21: Número de CD dérmicas/mm de membrana basal na pele normal de pacientes com PFE (com e sem tratamento), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CD dérmicas/mm de membrana basal			
	Cirurgia Plástica*	Cadáver♦	Paciente	
			com trat+	sem trat+
1	0,62	0,09	0,61	0
2	3,49	0,44	0	0,05
3	0,40	0,41	0	0
4	1,44	0,27	0,32	0,44
5	1,40	0,13	0,11	0,04
6	0,10	0,13	0,25	
7	0,43	0,09	0	
8	0,53	0,06	0	
9	0,33			
10	0,36			
11	2,08			
12	0,14			
Mediana	0,48	0,13	0,06	0,04

Teste de Kruskal-Wallis: *,♦: $p < 0,05$; *,+: $p < 0,001$

A comparação da quantificação das CL na pele normal de cirurgia plástica, de cadáver, de pele lesada de pacientes com e sem tratamento (Tabela 22) não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com relação ao número de CL/mm², número de CL/mm de membrana basal. Quanto ao número de CL/mm de camada córnea, CL apresentaram-se em maior número nos pacientes com PFE em tratamento em relação às CL de cirurgia plástica (7,77 e 4,42, respectivamente).

A quantificação de CD dérmicas/mm de membrana basal (Tabela 23) mostrou maior número de CD nos pacientes com PFE em relação às CD na pele normal de cirurgia plástica, sem diferença entre os que estavam ou não em tratamento.

Tabela 22: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea na pele lesada de pacientes com PFE (com e sem tratamento), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CL/mm ²				CL/mm membrana basal				CL/mm camada córnea			
	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (com trat)	Paciente (sem trat)	Cirurgia Plástica	Cadáver	Paciente (com trat)	Paciente (sem trat)	Cirurgia Plástica	Cadáver*	Paciente (com trat) ^Δ	Paciente (sem trat)
1	66,50	58,85	3,85	136,20	4,03	3,37	0,30	5,85	3,79	3,92	0,44	5,79
2	170,70	35,45	0	58,85	11,21	1,68	0	4,26	12,12	1,61	0	5,42
3	76,85	16,00	93,70	230,95	6,05	0,81	10,87	14,97	7,87	0,82	14,96	16,89
4	74,25	66,10	73,95	106,15	5,0	3,59	5,72	10,07	4,54	3,58	7,77	12,65
5	168,75	74,60	109,65	22,00	13,27	3,40	5,59	1,65	12,90	3,23	9,31	2,52
6	67,80	32,70	49,40	42,10	4,17	1,59	5,49	3,30	3,99	1,57	6,64	4,74
7	70,45	116,60	87,60	20,15	4,89	6,32	3,02	1,67	4,79	6,81	6,39	2,54
8	80,60	19,50	186,70	10,60	4,75	0,94	9,18	0,85	4,30	1,09	10,26	0,93
9	40,40		84,50	24,60	2,44		4,51	1,33	2,79		5,82	1,33
10	48,20		135,40	53,55	2,86		8,62	5,87	3,21		9,54	11,11
11	178,30		61,50	12,9	10,83		6,92	0,92	12,52		10,77	1,18
12	6,50				0,41				0,39			
Mediana	72,35	47,15	84,50	42,10	4,82	2,53	5,59	3,30	4,42	2,40	7,77	4,74

Teste de Kruskal-Wallis: * , ^Δ p<0,05

Tabela 23: Número de CD dérmicas/mm membrana basal na pele lesada de pacientes com PFE (com e sem tratamento), pele normal de cirurgia plástica e de cadáver

	CD dérmicas/mm de membrana basal			
	Cirurgia Plástica*	Cadáver [♦]	Paciente	
			com trat ⁺	sem trat ⁺
	0,62	0,09	1,33	2,92
	3,49	0,44	0	0,80
	0,40	0,41	1,11	0,52
	1,44	0,27	1,27	1,01
	1,40	0,13	0,61	3,44
	0,10	0,13	1,47	0,54
	0,43	0,09	1,22	0
	0,53	0,06	0	1,64
	0,33		0,28	0
	0,36		0,86	2,85
	2,08		1,10	0,05
	0,14			
Mediana	0,48	0,13	1,10	0,80

Teste de Kruskal-Wallis: *,[♦]: $p < 0,05$; *,⁺: $p < 0,05$

No grupo de pacientes com tratamento, usando o teste de Wilcoxon para duas amostras pareadas (Tabela 24), houve diferença estatisticamente significativa entre a pele normal e a pele lesada, na quantificação de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal, CL/mm de camada córnea e de CD dérmicas/mm de membrana basal, com número significativamente maior de CL e CD dérmicas na pele lesada que na pele normal dos doentes de PFE.

Tabela 24: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal, CL/mm de camada córnea e CD dérmicas/mm de membrana basal: comparação entre pele normal e pele lesada de pacientes de PFE, com tratamento (n = 8)

Paciente	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea		CD dérmicas/mm membrana basal	
	normal *	lesada ^Δ	Normal [♦]	lesada ^O	Normal [♦]	lesada ^O	normal [♦]	Lesada ^O
10	64,25	73,95	4,11	5,72	4,88	7,77	0,61	1,27
14	14,60	109,65	0,95	5,59	1,24	9,31	0	0.61
15	7,25	49,40	0,44	5,49	0,41	6,64	0	1.47
16	28,40	87,60	1,95	3,02	2,72	6,39	0,32	1.22
17	121,45	186,70	6,86	9,18	7,77	10,26	0,11	0
18	64,10	84,50	4,67	4,51	6,51	5,82	0,25	0.28
20	144,15	135,40	9,53	8,62	9,13	9,54	0	0.86
21	37,40	61,50	2,61	6,92	2,87	10,77	0	1.10
Mediana	50,75	86,05	3,36	5,66	3,88	8,54	0,06	0,98

Teste de Wilcoxon: *, ^Δ p<0,001; [♦], ^O p<0,05

No grupo de pacientes sem tratamento, usando o teste de Wilcoxon para duas amostras pareadas (Tabela 25), não houve diferença estatisticamente significativa entre a pele normal e a pele lesada, na quantificação de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal e CL/mm de camada córnea. Quanto às CD dérmicas, não houve número significativamente maior de CL na pele lesada comparada à pele normal dos pacientes de PFE sem tratamento, com $p > 0,05$.

Tabela 25: Número de CL/mm² de epiderme, CL/mm de membrana basal, CL/mm de camada córnea e CD dérmicas/mm de membrana basal: comparação entre pele normal e pele lesada de pacientes de PFE, sem tratamento (n = 5)

Paciente	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea		CD dérmicas/mm membrana basal	
	normal	lesada	normal	lesada	normal	lesada	normal	lesada
11	23,25	20,15	1,70	1,67	1,85	2,54	0	0
12	1,30	10,60	0,10	0,85	0,11	0,93	0,05	1,64
13	28,45	24,60	2,50	1,33	3,56	1,33	0	0
19	60,75	53,55	6,93	5,87	11,12	11,11	0,44	2,85
22	4,55	12,90	0,37	0,92	0,55	1,18	0,04	0,05
Mediana	23,25	20,15	1,70	1,33	1,85	1,33	0,04	0,05

Teste de Wilcoxon: não significativo

Quando os pacientes foram subdivididos, considerando-se tanto a forma clínica como a vigência ou não de tratamento no momento da biopsia (Tabela 26), e foi feita a quantificação das CL (3 medidas), observou-se que houve diferença entre os pacientes com quadro clínico localizado, sem e com tratamento, sendo o número de CL maior neste último grupo. Nos pacientes com quadro clínico generalizado, esta diferença só foi observada na medição do número de CL/mm² de epiderme. A quantificação de CD dérmicas/mm de membrana basal (Tabela 27) mostrou que ocorreu diferença estatística nos grupos com e sem tratamento, com quadro clínico generalizado. Devemos levar em conta que a divisão em subgrupos os tornou pequenos, o que pode ter trazido distorções na análise estatística.

O tempo de doença até a biopsia não influenciou o número de CD dérmicas na pele lesada de pacientes com PFE, com ou sem tratamento (Tabela 28).

Tabela 26: Número de CL/mm², CL/mm membrana basal e CL/mm camada córnea na pele lesada de pacientes com PFE, agrupados segundo quadro clínico e vigência de tratamento

	localizada						generalizada					
	CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea		CL/mm ²		CL/mm membrana basal		CL/mm camada córnea	
	Tratamento		Tratamento		Tratamento		Tratamento		Tratamento		Tratamento	
	Sem*	Com*	Sem*	Com*	Sem*	Com*	Sem*	Com*	sem	com	sem	com
	136,20	0	5,85	0	5,79	0	106,15	3,85	10,07	0,30	12,65	0,44
	58,85	109,65	4,26	5,59	5,42	9,31	22,0	93,70	1,65	10,87	2,52	14,96
	230,95	87,60	14,97	3,02	16,89	6,39	42,10	73,95	3,30	5,72	4,74	7,77
	20,15	186,70	1,67	9,18	2,54	10,26	53,55	49,40	5,87	4,51	11,11	6,64
	10,60	135,40	0,85	8,62	0,93	9,54		84,50		5,49		5,82
	24,60	61,50	1,33	6,92	1,33	10,77						
	12,90		0,92		1,18							
Mediana	24,60	98,63	1,67	6,26	2,54	9,43	47,83	73,95	4,59	5,72	7,93	6,64

Teste de Mann-Whitney: *,*: p<0,05

Tabela 27: Quantificação de CD dérmicas/mm membrana basal em pele lesada de pacientes com PFE, agrupados segundo forma clínica e vigência de tratamento

	Localizada		Generalizada	
	tratamento		tratamento	
	sem	com	sem*	com [♦]
	2,92	0	1,01	1,33
	0,80	0,61	3,44	1,11
	0,52	1,22	0,54	1,27
	0	0	2,85	1,47
	1,64	0,86		0,28
	0	1,10		
	0,05			
Mediana	0,52	0,74	1,93	1,27

Teste de Mann-Whitney: *,[♦]: p<0,05

Tabela 28: CD dérmicas/mm de membrana basal em biópsia de pele lesada de pacientes com PFE, com e sem tratamento, segundo tempo de doença (n=22)

≤ 3 meses		> 3 meses < 1 ano		≥ 1 ano	
Sem tratamento	Com tratamento	Sem tratamento	Com tratamento	Sem tratamento	Com tratamento
1,01	1,33	2,92		0,80	1,29
3,44	0	0,52		0,54	0,61
0,05	1,11	2,85		0	1,49
				1,64	1,22
				0	0
					0,28
					0,86
					1,10
Mediana					
1,01	1,11	2,85		0,54	0,98

Teste de Kruskal-Wallis: não significante

CL e CD no PFE e correlação com titulação de anticorpos séricos

Não houve correlação entre a quantificação de CL/mm² de epiderme e a titulação de anticorpos séricos por IFI, através do teste de Pearson, tanto na pele lesada como na pele normal de pacientes com PFE, com valores de $r=-0,2068$ e $-0,0919$, respectivamente (Tabela 29).

Tabela 29: Correlação entre número de CL/mm² de epiderme e titulação de anticorpos séricos por IFI, em pacientes com PFE

	CL/ mm ² epiderme		Título de IFI
	Pele normal	Pele lesada	
1		136,20	1: 2048
2		3,85	1: 8192
3		58,85	1:1024
4		0	1: 512
5		230,95	1: 512
6		106,15	1: 4096
7		22,00	1: 4096
8		42,10	1: 1024
9		93,70	1: 2048
10	64,25	73,95	1: 8192
11	23,25	20,15	1: 2048
12	1,30	10,60	1: 512
13	28,45	24,60	1: 512
14	14,60	109,65	1: 1024
15	7,25	49,40	1: 16384
16	28,40	87,60	1: 512
17	121,45	186,70	1: 1024
18	64,10	84,50	1: 512
19	60,75	53,55	1: 16384
20	144,15	135,40	1: 1024
21	37,40	61,50	1:2048
22	4,55	12,90	1:2048
Mediana	28,45	60,18	1:1536

Não houve correlação entre a quantificação de CL/mm de membrana basal e a titulação de anticorpos séricos por IFI, através do teste de Pearson, tanto na pele lesada como na pele normal de pacientes com PFE, com valores de $r=-0,0018$ e $0,0715$, respectivamente (Tabela 30).

Tabela 30: Correlação entre número de CL/mm de membrana basal e titulação de anticorpos séricos por IFI, em pacientes com PFE

	CL/mm membrana basal		Título de IFI
	Pele	Pele lesada	
	normal		
1		5,85	1: 2048
2		0,30	1: 8192
3		4,26	1:1024
4		0	1: 512
5		14,97	1: 512
6		10,07	1: 4096
7		1,65	1: 4096
8		3,30	1: 1024
9		10,87	1: 2048
10	4,11	5,72	1: 8192
11	1,70	1,67	1: 2048
12	0,10	0,85	1: 512
13	2,50	1,33	1: 512
14	0,95	5,59	1: 1024
15	0,44	5,49	1: 16384
16	1,95	3,02	1: 512
17	6,86	9,18	1: 1024
18	4,67	4,51	1: 512
19	6,93	5,87	1: 16384
20	9,53	8,62	1: 1024
21	2,61	6,92	1:2048
22	0,37	0,92	1:2048
Mediana	2,50	5,00	1:1536

Não houve correlação entre a quantificação de CL/mm de camada córnea e a titulação de anticorpos séricos por IFI, através do teste de Pearson, tanto na pele lesada como na pele normal de pacientes com PFE, com valores de $r=0,0880$ e $0,2113$, respectivamente (Tabela 31).

Tabela 31: Correlação entre número de CL/mm de camada córnea e titulação de anticorpos séricos por IFI, em pacientes com PFE

	CL/mm camada córnea		Título de IFI
	Pele normal	Pele lesada	
1		5,79	1: 2048
2		0,44	1: 8192
3		5,42	1:1024
4		0	1: 512
5		16,89	1: 512
6		12,65	1: 4096
7		2,52	1: 4096
8		4,74	1: 1024
9		14,96	1: 2048
10	4,88	7,77	1: 8192
11	1,85	2,54	1: 2048
12	0,11	0,93	1: 512
13	3,56	1,33	1: 512
14	1,24	9,31	1: 1024
15	0,41	6,64	1: 16384
16	2,72	6,39	1: 512
17	7,77	10,26	1: 1024
18	6,51	5,82	1: 512
19	11,12	11,11	1: 16384
20	9,13	9,54	1: 1024
21	2,87	10,77	1:2048
22	0,55	1,18	1:2048
Mediana	2,87	3,55	1:1536

Houve correlação entre a quantificação de CD dérmicas/mm de membrana basal e a titulação de anticorpos séricos por IFI, através do teste de Pearson, na pele lesada de pacientes com PFE, com valor de $r=0,4779$ e $p<0,05$. Na pele normal de pacientes com PFE não foi encontrada essa correlação, sendo $r=0,3802$ (Tabela 32, Figura 19). Não houve correlação entre a razão número de CL/ CD dérmicas (mm de membrana basal) e titulação de anticorpos séricos.

Tabela 32: Correlação entre número de CD dérmicas/mm de membrana basal e titulação de anticorpos séricos por IFI, em pacientes com PFE

	CD dérmicas/ mm membrana basal		Título de IFI
	Pele normal	Pele lesada	
1		2,92	1: 2048
2		1,33	1: 8192
3		0,80	1:1024
4		0	1: 512
5		0,52	1: 512
6		1,01	1: 4096
7		3,44	1: 4096
8		0,54	1: 1024
9		1,11	1: 2048
10	0,61	1,27	1: 8192
11	0	0	1: 2048
12	0,05	1,64	1: 512
13	0	0	1: 512
14	0	0,61	1: 1024
15	0	1,47	1: 16384
16	0,32	1,22	1: 512
17	0,11	0	1: 1024
18	0,25	0,28	1: 512
19	0,44	2,85	1: 16384
20	0	0,86	1: 1024
21	0	1,10	1:2048
22	0,04	0,05	1:2048
Mediana	0,04	0,91	1:1536

Figura 19: Correlação entre títulos de anticorpos séricos por IFI (ordenada) e número de CD dérmicas/mm de membrana basal (abscissa) em pacientes com PFE, $p < 0,05$

Não houve correlação entre a quantificação de CD dérmicas/mm de membrana basal e a titulação de anticorpos séricos por IFI quando os pacientes foram divididos segundo o quadro clínico localizado ou generalizado, sendo encontrados, através do teste de Pearson, $p > 0,05$ e $r = 0,1897$ para a forma localizada e $p > 0,05$ e $r = 0,4629$ para a forma generalizada (Tabela 33).

Tabela 33: Correlação entre número de CD derme/mm de membrana basal e titulação de anticorpos séricos por IFI, em pacientes com a forma clínica localizada e generalizada de PFE

	Localizada		Generalizada	
	CD derme/ mm membrana basal	Título de IFI	CD derme/ mm membrana basal	Título de IFI
	2,92	1: 2048	1,33	1: 8192
	0,80	1:1024	1,01	1: 4096
	0	1: 512	3,44	1: 4096
	0,52	1: 512	0,54	1: 1024
	0	1: 2048	1,11	1: 2048
	1,64	1: 512	1,27	1: 8192
	0	1: 512	1,47	1: 16384
	0,61	1: 1024	0,28	1: 512
	1,22	1: 512	2,85	1: 16384
	0	1: 1024		
	0,86	1: 1024		
	1,10	1:2048		
	0,05	1:2048		
Mediana	0,61	1: 1024	1,27	1: 4096

DISCUSSÃO

Titulação de anticorpos séricos por IFI no PFE

Na realização das reações de IFI, optou-se pela pele humana como substrato, levando-se em conta o estudo de FRIEDMAN et al., 1989, que mostrou que a pele humana (da cabeça e pescoço, da região abdominal anterior e de prepúcio de recém-nascido) proporciona resultados excelentes na execução da reação de IFI. Por esse motivo, no presente estudo, também optou-se pela utilização da pele da região abdominal.

Recentemente, HARMAN et al., 2000, reavaliaram a técnica de IFI comparando 2 substratos, pele humana e esôfago de macaco, usando soro de 29 pacientes com pênfigo nos quais havia sido feito previamente ELISA para detecção de Dg1 e Dg3. Na IFI com soro de PF, a sensibilidade foi maior quando utilizada a pele humana como substrato e os títulos resultaram em média 4,8 diluições maiores do que com o uso de esôfago de macaco. Por outro lado, para o soro de PV, houve maior sensibilidade quando utilizado esôfago de macaco, com títulos 4,4 diluições maiores do que a pele humana.

Com relação à utilização da solução-tampão Tris-acetato-cálcio para a IFI, não foram observados títulos mais altos quando comparados ao tampão PBS, em discordância com os resultados encontrados por MATIS et al., 1987, que, quando usaram pele humana (da cabeça e pescoço e prepúcio) como substrato e tampão PBS para IFI de 10 pacientes com PFE, encontraram títulos de até 1:400. Quando usaram pele humana e tampão suplementado com cálcio, encontraram títulos de 1:200 a 1:2600, embora não descrevam se os resultados foram significantes.

FRIEDMAN et al., 1989, também obtiveram os melhores resultados quando utilizaram a pele humana nas reações de IFI, com títulos de até 1:5120. No presente estudo,

as reações de IFI foram realizadas com diluições a partir de 1:2 e os resultados foram de 1:512 a 1:16384.

Os resultados variáveis obtidos na titulação de anticorpos por IFI poderiam ser explicados pela variação da expressão do antígeno do pênfigo de acordo com a região de pele utilizada como substrato, sendo maior na cabeça, pescoço, axilas e pernas, e menor no tórax e virilhas, conforme descrito por SISON-FONACIER & BYSTRYN, em 1986.

Já SQUIQUERA et al., 1988, realizaram IFI em 196 soros de pacientes com PFE, usando pele de prepúcio como substrato, tampão com cálcio e soros diluídos a partir de 1:20, com valores médios de 1:160 para pacientes com lesões localizadas e de 1:640 para as formas generalizadas (não descreveram qual foi o maior valor de título obtido).

No presente estudo, utilizando a região do abdome como substrato e tampão PBS, obtivemos títulos mais elevados do que nos estudos anteriores, podendo estar implicados, além do substrato empregado, reagentes de diferentes laboratórios e técnica do próprio executor.

Titulação de anticorpos séricos por IFI e forma clínica no PFE

A atividade do PFE e suas formas clínicas (generalizada e localizada) têm sido freqüentemente estudadas, de modo a correlacioná-las com a quantidade de auto-anticorpos circulantes.

Nos estudos com modelos animais (camundongos BALB/c recém nascidos), observa-se que há correlação entre títulos de anticorpos circulantes e extensão da doença. Dentre esses estudos, podemos citar o estudo de ROSCOE et al., 1985, que, além de mostrar o papel patogênico dos auto-anticorpos no PFE, mostrou que a extensão da doença se correlacionava com o título do anticorpo anti-epitelial injetado no peritônio dos camundongos e que, quando as injeções eram descontinuadas, não surgiam mais lesões novas e as antigas cicatrizavam. ESPAÑA et al, 1997, também observaram que a atividade da doença se correlacionava com a dose de IgG ou seus fragmentos proteolíticos injetados nos animais.

JUDD & LEVER, 1979, estudaram 63 casos de PF e PV, concluindo que a IFI era inferior à IFD para diagnóstico, porque poderia ser negativa na fase inicial da doença e, contrariamente aos relatos da literatura, não era adequada para avaliar o status da doença ou para orientar terapêutica nos pacientes com pênfigo.

SQUIQUERA et al., 1988, no estudo relatado previamente, encontraram título médio de IFI de 1:160 nos pacientes com lesões localizadas e 1:640 nos pacientes com lesões generalizadas, além de correlação entre título de anticorpos e atividade da doença.

Utilizando pele normal como substrato, FRIEDMAN et al., 1989, encontraram títulos de IFI com variação de 1:40 a 1:280 para a forma localizada, e de 1:160 a 1:5120 para a forma generalizada. A média dos títulos foi maior para a forma generalizada (460,8) do

que para a localizada (299,2), mas alguns casos de forma localizada tiveram títulos mais elevados do que casos de forma generalizada. Isto reforçou o conceito que o emprego de títulos de anticorpos como parâmetro de atividade clínica e como orientador terapêutico não se justificava. Ao observar mais minuciosamente os prontuários dos pacientes, foi constatado que os grupos localizado e generalizado não eram clinicamente homogêneos, apresentando grau variável de atividade clínica intragrupal, sendo que alguns pacientes eram mantidos na forma localizada às custas de tratamentos prolongados com doses elevadas de imunossupressores.

No presente estudo, os títulos de anticorpos séricos variaram de 1:512 a 1:16384, sendo que, nos pacientes com quadro localizado, a média foi de 1:1024, e nos pacientes com forma generalizada, a média foi de 1:4096, tendo sido a diferença estatisticamente significativa.

Assim como FRIEDMAN et al., 1989, também pudemos constatar a grande variação intragrupal entre os pacientes do grupo localizado e generalizado. Dentre os pacientes com quadro localizado, encontramos pouca variação nos títulos de anticorpos (1:512 a 1:2048). No grupo generalizado, os títulos variaram de 1:512 a 1:16384, isto é, 5 diluições de diferença, sendo que três pacientes possuíam títulos semelhantes aos encontrados para pacientes com a forma localizada.

O paciente que está ilustrado na Figura 2 (C e D) apresentava título de IFI de 1:512, porém já estava doente e em uso de corticóides sistêmicos há 12 anos e já havia apresentado quadros eritrodérmicos (quando foram realizadas sessões de plasmaférese), sendo que no momento da coleta de sangue estava em uso de 30mg de prednisona por dia, com controle parcial da doença. Um dos pacientes que apresentava quadro generalizado e IFI de 1:1024 evoluiu com fácil e rápido controle do quadro clínico com uso de 50mg de prednisona por

dia. Outro paciente, com IFI de 1:2048 e forma generalizada, encontrava-se em tratamento com 60mg de prednisona por dia, há 1 mês, quando foi feita a coleta de sangue, o que pode ter contribuído para um título baixo para um quadro clínico generalizado.

Na casuística de SANTI, 1997, composta por pacientes com PFE sem tratamento, na forma localizada, o título de IFI variou de negativo a 1: 1280, enquanto na generalizada, de 1:640 a 1:5120.

No presente estudo, obtivemos resultados semelhantes aos estudos citados anteriormente, que mostram correlação entre a titulação de anticorpos séricos por IFI e a extensão do PFE. Porém, podemos dizer que o uso de valores de IFI como parâmetro de atividade clínica e orientador terapêutico deve ser criterioso, uma vez que títulos baixos não necessariamente correspondem a formas localizadas.

Titulação de anticorpos séricos e tratamento do PFE

São poucos os estudos que avaliam a titulação de anticorpos em relação ao tratamento do PFE. JUDD & LEVER, 1979, estudaram 63 casos de PF e PV e observaram que dose alta de prednisona diminuía a atividade da doença, acompanhada ou seguida pela queda dos títulos de anticorpos. Porém, nos que não estavam recebendo dose alta de prednisona, não havia correlação previsível entre a atividade da doença e título de anticorpos.

No presente estudo, também não encontramos diferença estatística nos títulos de anticorpos séricos por IFI em pacientes com e sem tratamento, com medianas de 1:1024 e 1:2048, respectivamente. Porém, avaliamos grupos muito heterogêneos de pacientes. Os pacientes em tratamento foram agrupados em um único grupo, independentemente do tipo

de tratamento (que variou de 5 a 60mg de prednisona por dia, associada ou não a 250mg de difosfato de cloroquina) ou do tempo de tratamento (de 2 dias a 25 anos) ou do quadro clínico (localizado ou generalizado). Não foi encontrada diferença estatística quando os grupos com e sem tratamento foram subdivididos segundo o quadro clínico localizado ou generalizado.

Caracterização das células dendríticas

As CL possuem aspectos imunofenotípicos característicos que permitem a sua imunomarcação. Dentre os antígenos, os mais facilmente detectáveis são: o marcador pan-hematopoiético CD45, os antígenos de classe II do MHC, a proteína S-100, o antígeno do cito-esqueleto vimentina e o antígeno CD1a. Este último, anteriormente denominado OKT6, é uma proteína de 43 a 49kD, também presente em timócitos corticais, com alta expressão na superfície e no citoplasma das CL e com baixa expressão nas CD dérmicas.

Os estudos sobre a presença do marcador CD1a em células da medula óssea e no sangue periférico sugeriram a hipótese de que as CL epidérmicas fossem provenientes das células CD1a+ da medula óssea e, através da circulação sanguínea, chegassem até a pele, de onde migrariam para a epiderme por meio de mecanismo desconhecido. Células semelhantes às CL, denominadas células indeterminadas, podem ser detectadas na derme, porém não apresentam os grânulos de Birbeck característicos. As células indeterminadas expressam moléculas CD1a e MHC classe II, porém algumas podem ser CD1a negativas. Poder-se-ia formular a hipótese de que as células indeterminadas representassem precursores das CL em direção à epiderme ou que resultassem das CL da epiderme migrando para o linfonodo regional (TEUNISSEN et al., 1992). Para as células indeterminadas, NESTLE &

NICKLOFF, 1995, usaram a denominação de células dendríticas dérmicas. Consideraram que apenas uma subpopulação dessas células (10-15%) expressa marcadores mielóides precoces CD14 ou CD1a.

No estudo dos anticorpos monoclonais anti-Ia (HLA-DR) e anti-T6 e sua sensibilidade na identificação das CL, HARRIST et al., 1983, detectaram que T6 é mais sensível que Ia para a definição da população de CL, além de ser mais adequado para identificar CL em doenças, pois uma variedade de células inflamatórias reage com o anticorpo anti-Ia.

A comparação entre os anticorpos anti-OKT6 e anti-S100 mostrou que o anticorpo OKT6 é superior ao S100 para identificação de CL na epiderme: ambos marcam células morfológicamente semelhantes (células dendríticas) mas não oferecem resultados comparáveis quanto à distribuição e frequência das células (MODLIN et al., 1984).

Para avaliar a expressão dos antígenos HLA-DR e T6, em 66 biopsias de pele representando diferentes dermatoses, DRIJKOMINGEN et al., 1986, demonstraram que na derme todas as células eram OKIa1+, enquanto apenas algumas expressavam o antígeno T6 e/ou ATPase, o que mostra a heterogeneidade da população de células dérmicas com processos dendríticos. Como a expressão de marcadores de superfície é influenciada pelo estado funcional das células, ambos os anticorpos monoclonais podem reconhecer subpopulações funcionalmente diferentes na epiderme e na derme.

No presente estudo, devemos levar em conta que os valores obtidos podem estar subestimados, pois não consideram subpopulações de CD que não expressam o antígeno de superfície CD1a, assim como não determinam se as células são funcionalmente ativas ou não.

Diferentes métodos de quantificação das CL

BIEBER et al., 1988, compararam diferentes métodos para enumeração das CL em cortes congelados verticais da epiderme, com o anticorpo monoclonal OKT6. Utilizaram pele normal e pele lesada de pacientes com eczema atópico e psoríase vulgar, comparando os valores encontrados utilizando seis métodos diferentes de quantificação:

a) unidimensionais

- 1) CL/ 20 campos
- 2) CL/ mm de superfície epidérmica (morfometria)
- 3) CL/ mm de membrana basal (morfometria)
- 4) CL/ 200 células basais (morfometria)

b) bidimensionais

- 5) CL/ mm² (grid)
- 6) CL/ mm² (morfometria)

Os resultados encontrados mostraram grau de variabilidade acentuado, dependendo do método usado e do tipo de doença estudada. Assim, pôde-se afirmar que a contagem de células por campo não era adequada para comparação entre pele normal e pele lesada, enquanto que a contagem de células por mm de extensão da epiderme seria adequada, baseando-se na consideração que o número de CL devesse ser independente da espessura da epiderme. A quantificação de CL por mm de membrana basal refletiria a espessura da epiderme de uma maneira mais confiável, porém exigiria um equipamento de análise morfométrica. A quantificação de CL por mm² usa escala bidimensional e poderia ser feita com ocular quadriculada ou análise morfométrica, porém os resultados foram contraditórios. Quando a contagem é feita com a ocular, o investigador tende a super ou subestimar os

valores, possivelmente devido à impossibilidade de adaptar o "grid" à configuração convoluta na papilomatose e à tendência de selecionar áreas com marcação positiva. Os autores concluíram que a maior dificuldade na escolha do método estava ligada ao entendimento do papel das CL na epiderme. Assim, quando se considera que as CL apenas formam rede suprabasal, parâmetro unidimensional pode ser usado. No entanto, admitindo-se o conceito que a CL é uma célula apresentadora de antígenos para toda a epiderme, o método mais apropriado parece ser a quantificação em uma área bidimensional da epiderme usando análise morfométrica.

Assim, tendo por base os argumentos acima descritos por BIEBER et al., 1988, optamos pela quantificação das CL e CD dérmicas por meio de análise morfométrica, realizando a medição da área da epiderme (método bidimensional), da extensão da membrana basal e da camada córnea (métodos unidimensionais).

Células de Langerhans: variações regionais

As CL apresentam variações quantitativas, influenciadas por localização anatômica, exposição solar (radiação ultravioleta), idade, medicações tópicas e sistêmicas, imunossupressão.

No grupo controle, utilizando pele proveniente tanto de cirurgia plástica como cadáver, optamos pela utilização de pele da região torácica anterior, levando em conta o estudo de BERMAN et. al., 1983, que estudaram 112 biopsias de pele de pacientes e de cadáveres e mostraram que não havia diferença estatisticamente significativa nas densidades das CL em diferentes regiões anatômicas (cabeça e pescoço, tórax anterior e posterior, membros superiores e inferiores, nádegas e genitais), exceto a planta dos pés, com densidade menor (58 ± 12 células/mm²). Encontraram no tronco anterior densidade de 466 ± 22 células/mm² e não encontraram diferenças entre raças ou entre pacientes e cadáveres.

Por meio de análise morfométrica (número de células/ mm de membrana basal) da pele de 5 locais diferentes (dorso das mãos, dorso dos pés, tronco, braços e pernas) de 6 voluntários do sexo masculino, HORTON et al., 1984, encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os sítios anatômicos no mesmo indivíduo e entre locais semelhantes em diferentes indivíduos. No tórax, encontraram $10,45 \pm 0,436$ células/mm membrana basal. Assim, consideraram que o melhor controle seria a pele normal adjacente à pele lesada.

Outro estudo, realizado por CHEN et al., 1985, mostrou que a pele do tronco, couro cabeludo, braços e pernas possuíam densidades semelhantes de CL ($740 \pm 28,97$ células/mm² no tronco), face e pescoço continham maior densidade ($976 \pm 30,93$ células por

mm²), enquanto que região sacrococcígea, palmas e plantas possuíam a menor densidade ($267 \pm 56,14$ e $189 \pm 19,15$ células por mm², respectivamente). Também não foi encontrada diferença de densidade quanto ao sexo e raça ou entre pele de cadáveres e de cirurgia plástica.

Com base em THIERS et al., 1984, também optamos pela utilização da pele de tórax anterior por ser região protegida da exposição solar, pois há diminuição das CL na pele de idosos, sendo mais acentuada na pele foto-exposta.

Quando se fala em biopsia do tronco anterior, não há menção de biopsia de pele de mama nos trabalhos consultados. Considerando-se tronco anterior ou posterior, nossos resultados são semelhantes aos resultados de trabalhos que empregam análise morfométrica (assinalados na Tabela 34).

No atual trabalho, foram encontradas as medianas: 72,35 CL/mm² no grupo de cirurgia plástica de mama e 47,15 CL/mm² na pele do tórax anterior de cadáveres; 4,53 CL/mm de membrana basal na pele de cirurgia plástica de mama e 2,53 CL/mm de membrana basal nos cadáveres e 4,42 CL/mm de camada córnea na pele de cirurgia plástica de mama e 2,42 CL/mm de camada córnea na pele dos cadáveres.

Tabela 34: Quantificação das CL epidérmicas na pele normal, segundo diferentes autores

autor, data	número de indivíduos e sexo	idade	número de biopsias	regiões anatômicas	imunomarcador	método de quantificação	número de CL encontradas	
BERMAN et al., 1983	16 pacientes cirúrgicos (10 mulheres) e 4 cadáveres (1 mulher)	26 a 86 anos	112 (30 do tórax)	cabeça e pescoço, tórax anterior e posterior, membros superiores e inferiores, nádegas, genitais, pés	anti-T6*	grade ocular planimétrica (mm ²)	tórax anterior: 466±22 tórax posterior: 466±11	
HORTON et al., 1984	6 homens	21-24 anos	30 (6 do tórax)	mão, pé, perna, braço, tronco	OKT6*	morfometria (CL/mmMB)	tórax: 10,45±0,436♠	
CHEN et al., 1985	51 (pacientes cirúrgicos e cadáveres), 37 homens	18-60 anos (80% < 40 anos),	117 (39 do tórax)	tronco, perna, braço, couro cabeludo, mucosa oral, face, pescoço, sacro-cóccix, palma, planta, córnea	ATPase	grid (mm ²)	tronco: 740±28,97	
BIEBER et al., 1988	5 indivíduos		5 (tórax)	tórax posterior	OKT6*	CL/20 campos CL/mm epiderme CL/mmMB CL/200 células basais CL/mm ² grid CL/mm ² (morfometria)	tórax: 96±47 9,08±3,15♦ 5,78±2,05♠ 8,85±2,29 73,6±36,4 101,2±34,2●	
CHIOSSI, 2001	12 pacientes de cirurgia plástica de mama (12 mulheres) e 8 cadáveres (3 mulheres)	21 a 76 anos (média: 43 anos)	20 (tórax)	tórax	CD1a*	morfometria	cirurgia plástica	cadáver
						CL/mm ²	72,35●	47,15●
						CL/mmMB	4,53♠	2,53♠
						CL/mm camada córnea	4,42♦	2,42♦
						CD dérmicas mm MB	0,48	0,13

*: nomenclaturas diferentes para o mesmo imunomarcador

♠, ♦, ●: resultados semelhantes

Quantificação de CL e CD dérmicas na pele normal

A premissa de escolha de pele de cadáver e de cirurgia plástica como controles foi de se constituir um único grupo controle, já que na literatura o número de CD encontrado em ambos é semelhante. Porém, ao contrário dos relatos de BERMAN et al., 1983, e CHEN et al., 1985, que não encontraram diferença entre a densidade de CL na pele de indivíduos vivos e de cadáveres, no atual estudo foi constatada diferença estatística, sendo significativamente maior na pele de pacientes submetidos à cirurgia plástica que nos cadáveres. Esse achado pode ser resultado da diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$, entre as idades dos grupos controle-cadáver e o grupo controle-cirurgia plástica, uma vez que em ambos as biopsias foram colhidas do mesmo local (tórax anterior). Os cadáveres apresentavam idades com média de $52,13 \pm 16,63$ anos (35,5 a 68,8) e os pacientes de cirurgia plástica apresentavam idades com média de $36,83 \pm 9,47$ anos (27,4 a 46,3). Portanto, o grupo de cadáveres apresentou menor número de CL, provavelmente por ser mais idoso. Outra hipótese seria a de que, no grupo cadáver, as CL perderiam expressão de proteínas de superfície "post mortem", embora nos trabalhos de literatura, não houvesse diferença entre vivos e cadáveres.

Quantificação das CL e CD dérmicas nas dermatoses bolhosas

São poucos os relatos sobre quantificação de CD em dermatoses bolhosas. Os dados da literatura quanto à população de CL epidérmicas são conflitantes, como podem ser constatados nos estudos de NESTOR et al.,1987; PICUT et al.,1987; MASHKILLEYSON et al., 1989, embora esses resultados possam ser decorrentes de metodologias distintas utilizadas em cada estudo, como podemos observar na Tabela 35.

Tabela 35: Quantificação das CL e CD dérmicas nas doenças bolhosas, segundo diferentes estudos

Autor, data	doença bolhosa	número de pacientes	grupo controle	imunomarcacão das CD	método de quantificação	número de CD na lesão	número de CD na pele perilesional	número de CD na pele normal de paciente	número de CD na pele normal (controle)
NESTOR et al., 1987	PV, PB, DH, IgA linear	PV: 10 PB: 11 DH: 9 IgA linear: 2	5 normais	Leu6*	grid (mm ²)		PV: 59±8 PB: 89±14 DH: 29±4 IgA linear: 67±13		20±4
PICUT et al., 1987	PV	30 (19 biopsias de lesão, 11 biopsias de pele normal)	9 normais	anti-OKT6* e anti-HLA-DR	não foi feita quantificação				
EMTESTAM et al., 1987	PB	13 (pele normal e lesão)	18 normais	anti- OKT6*	4mm epiderme	59,7±13,6		42,5±10,4	42,6±13,9
MASHKILLE YSON et al., 1989	PV	7 (pele normal e perilesional)		OKT6*	não foi feita quantificação				
GARIOCH et al., 1994	DH	10 (pele normal e lesão)		CD1a*	6 campos (número de células/campo)				
SANTI, 1997	PFE	20 (lesão e perilesional)		CD1a*	análise semi-quantitativa				
CHIOSSI, 2001	PFE	22 (lesão e pele normal)	20 normais	CD1a*	morfometria				
								cirurgia plástica	cadáver
					CL/mm ²	60,18	28,45	72,35	47,15
					CL/mmMB	5,00	2,50	4,53	2,53
					CL/mm camada córnea	3,55	2,87	4,42	2,42
					CD dérmicas/mmMB	0,98	0,04	0,48	0,13

*: nomenclaturas diferentes para o mesmo imunomarcador

Células de Langerhans no PFE

Na literatura pesquisada, encontramos apenas um trabalho, realizado por SANTI, 1997, que estudou 20 pacientes, de 12 a 82 anos (média: 38,75 anos), utilizando biopsia de lesão de PFE e pele perilesional e marcação das células de Langerhans com o anticorpo CD1a. O estudo demonstrou que a população de CL estava diminuída na epiderme lesada, quando comparada à epiderme perilesional, e que o número de células dendríticas da derme era maior na pele lesada que na pele perilesional. Não foi observada diferença na população de células dendríticas CD1a epidérmicas ou dérmicas nas formas clínicas localizada ou generalizada. A diminuição da população de células dendríticas epidérmicas na pele lesada foi explicada pela sua possível migração para a derme, onde foram encontradas em maior número que na pele perilesional. Assim, a comparação dos resultados por nós obtidos pôde ser feita apenas com relação a esse estudo.

Encontramos o número de CL na lesão de PFE semelhante ao da pele normal do grupo controle, estando aumentado apenas quando se compara com o grupo cadáver na medida de CL/mm de camada córnea.

O número de CL na pele normal de PFE pode ser considerado semelhante ao do grupo controle, sendo menor do que do grupo controle de cirurgia plástica apenas quando se considera a quantidade de CL/mm².

No mesmo paciente, encontramos o número de CL na epiderme lesada maior que na pele normal, enquanto SANTI, 1997, encontrou um número menor de CL na epiderme lesada que na pele perilesional.

Ainda lembramos que, na área lesada, devido à bolha, o número de CL em alguns cortes pode ter sido subestimado devido à inclusão da bolha na área total calculada. Portanto,

se encontramos quantidade de CL na pele lesada maior do que na pele aparentemente sã de PF, esse resultado deve ser considerado. Da mesma forma, o número de CL na pele lesada pode ter sido semelhante ao número dos controles por esse mesmo motivo.

Se lembrarmos que o grupo de pacientes do atual estudo contém alguns doentes em tratamento e se considerarmos como verdadeira a afirmação que a corticoterapia reduz o número de CL, poder-se-ia formular a hipótese de que o tratamento levou à redução maior no número de CL na pele normal que na lesada ou que, na lesão, o número de CL é tão grande que, mesmo com alguma diminuição pelo tratamento, ainda estão em número suficiente para resultar em significância estatística quando comparadas à pele normal dos pacientes.

CD dérmicas no PFE

No atual estudo observamos que, considerando-se o grupo cadáver como controle, o número de CD dérmicas na pele lesada de PFE está aumentado, mesmo não havendo diferença significativa entre a faixa etária desses grupos. A comparação entre a pele normal dos doentes com a dos controles mostra que há maior número de CD na derme do grupo controle de cirurgia plástica que nos pacientes com PFE. Uma explicação para esse achado é que os pacientes constituem um grupo heterogêneo e, em muitos deles, a corticoterapia poderia estar levando a um declínio na quantidade de CD dérmicas.

O número de CD dérmicas na pele sã e lesada de PFE só é maior que na pele do grupo cadáver se consideramos o grupo como um todo. Ao dividirmos os pacientes em grupos com e sem tratamento, em ambos persiste o maior número de CD na derme comparados ao grupo cadáver. Se aventarmos a hipótese de que as CD podem ter sofrido

perda da função e, portanto, perda da imunofenotipagem, no grupo cadáver haveria uma medida subestimada e, portanto, no PFE as CD dérmicas poderiam estar em número semelhante ao de ambos os grupos controles.

Analisando um mesmo paciente com PFE, encontramos um número maior de CD dérmicas na pele lesada comparada à pele normal. Esse achado está em concordância com os resultados encontrados por SANTI, 1997, quando comparou pele lesada com pele perilesional.

Em resumo, considerando-se o grupo de pacientes como um todo, sem ser considerada sua heterogeneidade, poder-se-ia dizer que as CL têm seu número inalterado na lesão de PFE e as CD dérmicas estão em maior número na lesão de PFE, quando comparadas aos controles. Considerando um mesmo paciente, tanto as CL como as CD da derme estão em número maior na lesão, em comparação com a pele normal.

Razão entre número de CL e CD dérmicas

Quando se comparam as razões número de CL/ número de CD derme, utilizando a medida mm de membrana basal, entre os grupos controles de cirurgia plástica e cadáveres não se observa diferença estatística. Também não há diferença estatística ao se comparar a pele lesada e aparentemente sã no mesmo paciente. Provavelmente o tamanho amostral pequeno, devido aos resultados indeterminados, justifique esse achado.

Por outro lado, a razão número de CL/ número de CD dérmicas na pele lesada do paciente com PFE é menor que a do grupo controle cadáver, contribuindo para o achado de maior número de CD na derme na pele lesada do PFE.

Ao se considerar os grupos controles oriundos plástica de mama e cadáver como um único grupo, novamente a razão número de CL/ número de CD dérmicas na lesão de PFE é menor do que no grupo controle, enfatizando o aumento do número de CD na derme na lesão de PFE. Quanto à pele sã do PFE, a razão é semelhante ao do grupo controle.

Quantificação das CL e CD dérmicas no PFE: quadro clínico localizado ou generalizado

Para melhor compreensão dos resultados descritos acima, dividimos os pacientes de acordo com a gravidade do quadro clínico em forma localizada ou generalizada.

Não achamos diferença entre o número de CL de pele normal de pacientes com a forma localizada ou generalizada de PFE quando comparado ao dos grupos controles, nem diferença entre o número de CL da epiderme lesada de pacientes com a forma localizada ou generalizada de PFE em relação aos controles. O número de CL na pele normal de paciente com lesões localizadas mantém-se menor que no grupo controle de cirurgia plástica, de maneira semelhante ao que ocorre quando se considera o grupo de pacientes como um todo.

Porém, há diferença entre número de CD da derme de pele normal de pacientes com a forma localizada e generalizada de PFE, sendo maior na forma generalizada. Assim, pode-se dizer que as CD dérmicas estão aumentadas na lesão dos pacientes com PFE, principalmente às custas do maior número de CD na forma generalizada.

Ao se comparar pele lesada com pele normal do mesmo paciente de PFE, na forma localizada, as CL e CD dérmicas estão em maior número na lesão. Na forma generalizada de PFE, apenas as CD dérmicas estão em maior número na lesão. SANTI, 1997, não encontrou diferença na análise semi-quantitativa das CD na forma clínica localizada ou generalizada.

Quantificação das CL e CD dérmicas no PFE: variação com o tratamento

Vários fatores podem levar à alteração na densidade de CL na epiderme: exposição solar (THIERS et al., 1984; GILCHREST et al., 1982), idade (THIERS et al., 1984; GILCHREST et al., 1982), imunossupressão em pacientes transplantados renais (GALVÃO et al., 1998), tratamentos dialíticos (GALVÃO et al., 1998; METTANG et al., 1993), assim como o uso de medicações: PUVAterapia para psoríase (FRIEDMANN, 1981), injeções intradérmicas de interferon α -2 β (TONG et al., 1993), etretinato para psoríase vulgar, pustulose palmo-plantar e líquen plano hipertrófico (KOULU & JANSÉN, 1982).

A literatura também nos mostra o efeito da corticoterapia sobre as CD. O uso de corticosteróides tópicos leva à diminuição no número de CL e na sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos (ASHWORTH et al., 1988). A aplicação tópica de corticosteróides na pele humana, na de ratos e na de porcos leva à redução seletiva na expressão de receptores de superfície das CL, com reversão após suspensão da exposição à medicação (BERMAN et al., 1983). A administração sistêmica de dexametasona e prednisolona resulta em diminuição das CL epidérmicas em camundongos, além de perda dos grânulos de Birbeck à análise ultraestrutural (BERNATECK et al., 1996). BELSITO et al., 1982, também demonstraram que a administração tópica e sistêmica de glicocorticóides potentes em cobaias resulta em diminuição na densidade das CL, relacionada à concentração e potência vasoconstritora da droga usada.

No atual trabalho, as CL na pele normal de paciente com PFE estão em quantidade semelhante à da pele normal dos grupos controles, quando o grupo de pacientes é

subdividido de acordo com a vigência de tratamento. Também não há diferença quando se compara a pele normal do paciente com tratamento com a do paciente sem tratamento. Na derme, a quantidade de CD/mm de membrana basal é menor na pele normal de paciente que na dos grupos controles e não há diferença entre os grupos com e sem tratamento. Na pele lesada de PFE em tratamento, as CL estão em maior número que na pele normal de cadáver quando a medida é feita em mm de camada córnea. Na derme, também há maior número de CD na pele lesada de pacientes, independentemente da presença de tratamento, em relação à pele dos controles.

Ao se usar como controle a pele normal do próprio paciente, obtém-se maior número de CL e de CD dérmicas na pele lesada que na pele normal do paciente com tratamento. No grupo de pacientes sem tratamento, essa diferença não é observada, provavelmente pelo pequeno tamanho amostral do grupo. Embora à primeira vista pareça paradoxal o achado de maior número de CD no grupo em tratamento, uma hipótese para esse achado seria o critério da escolha da área biopsiada ter sido baseado na atividade da lesão. Assim, com ou sem tratamento, a lesão se apresentava em atividade.

As CL e CD dérmicas na pele normal e lesada de PFE estão em quantidade semelhante nos grupos com e sem tratamento, reforçando a hipótese da importância da atividade da lesão.

Quando é feita a comparação entre as CL e CD dérmicas da pele normal e lesada do paciente, elas encontram-se em maior número na lesão, independentemente da vigência de tratamento.

Assim, pode-se dizer que a pele normal do paciente não deve ser usada como único grupo controle no estudo das CD no PFE, uma vez que mostra resultados estatisticamente

significantes quando comparada à pele lesada, mas não significante quando comparada à pele normal do indivíduo sem dermatoses.

Quando os pacientes são subdivididos segundo os critérios apresentação clínica e tratamento, observa-se que o número de CL é maior no paciente com lesões localizadas com tratamento que no paciente sem tratamento. Já na forma generalizada, encontramos o mesmo achado, apenas na medida de área de epiderme. Porém, esperar-se-ia o contrário, que as CL estivessem em menor número no paciente com tratamento devido ao efeito do corticóide. Poder-se-ia supor que os pacientes em tratamento apresentassem maior tempo de evolução da doença e que a cronicidade estaria mantendo número elevado de CL na lesão. Também deve-se considerar que os pacientes estavam em tratamento porém não estavam curados, isto é, possuíam lesões ativas (as quais foram biopsiadas) e portanto o tratamento não estava sendo suficiente para conter a produção de auto-anticorpos. Outro dado significativo é que a divisão em subgrupos tornou o número de pacientes em cada subgrupo muito pequeno, tornando a análise estatística sujeita a erros. Poderíamos concluir que a quantidade de CL na lesão de PFE estaria relacionada com a atividade da doença e não com a forma clínica ou tratamento.

Observamos neste nosso estudo que, na derme, as CD estão em maior número na forma generalizada sem tratamento que na forma generalizada com tratamento, de maneira inversa ao observado para as CL. Da mesma forma, preferimos pensar em atividade da lesão e não relacionar o resultado à forma clínica ou ao tratamento.

CD no PFE e correlação com titulação de anticorpos séricos

A correlação significativa entre titulação de anticorpos séricos por IFI e número de CD dérmicas na lesão de PFE é um indicativo de que as CD dérmicas podem exercer papel importante na patogênese do PFE, possivelmente mais significativo que o das CD epidérmicas. Como a acantólise no PFE é intraepidérmica e a deposição de auto-anticorpos ocorre ao nível intercelular epidérmico, poder-se-ia supor que as CD estariam transitando pela derme em direção ao linfonodo regional, em concordância com SANTI et al., 1997, tornando-se estimuladora de linfócitos T na indução da resposta imune e produção de auto-anticorpos.

Novas perspectivas

O aumento de IL-12 sérica no PFE (ZEOTI et al., 2000), produzida também pelas CL, poderia ser justificado pela maior quantidade destas células na lesão de pênfigo, em especial na derme. O conhecimento de que as CL são produtoras de óxido nítrico (NO) (QURESHI et al., 1996) e a hipótese de que poderiam ser responsáveis pela formação da lesão bolhosa no PF ao produzir NO (de maneira semelhante ao que ocorre no eritema polimorfo, na necrose epidérmica tóxica, LERNER et al., 2000b) podem justificar o encontro de maior número de CL na epiderme da lesão do PF comparada à pele aparentemente sã. Além das dermatoses supracitadas, foi descrito mecanismo semelhante na doença do enxerto versus hospedeiro (LERNER et al., 2000a), lembrando que essas dermatoses podem apresentar sinal de Nikolsky positivo. Cabe, portanto, estudar a interação CD - IL-12 - NO no PFE, para melhor elucidação da fisiopatologia dessa dermatose auto-imune.

CONCLUSÕES

- 1- Há correlação entre titulação de anticorpos séricos por IFI e forma clínica do PFE, sendo esse maior na forma generalizada.
- 2- O número de CL na lesão e na pele normal do PFE é semelhante ao número de CL na pele dos grupos controles (plástica de mama e cadáver).
- 3- O número de CD dérmicas na pele lesada de pacientes com PFE é semelhante ao do grupo controle de plástica de mama, mas maior do que o do grupo cadáver.
- 4- A razão número de CL/ mm de membrana basal e número de CD dérmicas/mm de membrana basal é menor na pele lesada do paciente com PFE comparada à do grupo controle, confirmando maior número de CD na derme de pele lesada no PFE.
- 5- As CL e CD da derme encontram-se em maior número na lesão de PFE quando comparadas às da pele normal no mesmo paciente.
- 6- As CD dérmicas estão em maior número na pele de pacientes com a forma generalizada comparada à forma localizada do PFE.
- 7- Há correlação direta entre número de CD dérmicas na lesão de PFE e titulação de anticorpos séricos por IFI.

RESUMO

Com o propósito de colaborar na elucidação da fisiopatologia do pênfigo foliáceo endêmico (PFE), realizou-se titulação de anticorpos séricos e quantificação das células de Langerhans (CL) e células dendríticas dérmicas (CD) na pele de pacientes com PFE. Sangue e biopsia de pele de lesão ativa foram colhidos de 22 pacientes com PFE e, em 13 deles realizou-se também biopsia de pele normal não adjacente à lesão, em área não exposta ao sol. Dos 22 pacientes, 13 apresentavam a forma clínica localizada e 9, generalizada; 11 estavam em tratamento. O grupo controle constituiu-se de pele normal obtida da região torácica anterior de 8 cadáveres e de 12 mulheres submetidas à cirurgia plástica (mastoplastia). A imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada com pele humana normal da região abdominal como substrato e anti-IgG humana. A identificação das CL e CD foi feita pela técnica imunohistoquímica da avidina-biotina-peroxidase com o anticorpo anti-CD1a e quantificação por análise morfométrica. Houve correlação entre a titulação de anticorpos séricos por IFI e a forma clínica do PFE, sendo esse maior na forma generalizada. O número de CL na lesão ($60,18 \text{ CL/mm}^2$; $5,00 \text{ CL/mm}$ de membrana basal (MB); $3,55 \text{ CL/mm}$ de camada córnea) e na pele normal do PFE ($28,45 \text{ CL/mm}^2$; $2,50 \text{ CL/mm}$ de MB; $2,87 \text{ CL/mm}$ de camada córnea) foi semelhante ao número de CL na pele dos grupos controles de cirurgia plástica ($72,35 \text{ CL/mm}^2$; $4,53 \text{ CL/mm}$ de MB; $4,42 \text{ CL/mm}$ de camada córnea) e de cadáveres ($47,15 \text{ CL/mm}^2$; $2,53 \text{ CL/mm}$ de MB; $2,42 \text{ CL/mm}$ de camada córnea). O número de CD dérmicas na pele lesada de PFE ($0,98 \text{ CD/mm}$ de MB) foi semelhante ao do grupo controle de plástica de mama ($0,48 \text{ CD/mm}$ de MB), porém maior do que o do grupo cadáver ($0,13 \text{ CD/mm}$ de MB). A razão entre o número de CL e CD dérmicas foi menor na pele lesada do paciente com PFE comparada à dos grupos controles, confirmando maior número de CD na derme. Num mesmo paciente, as CL e CD da

derme encontravam-se em maior número na lesão de PFE (61,50 CL/ mm²; 5,49 CL/ mm de MB; 6,64 CL/mm de camada córnea, 0,86 CD dérmicas/ mm de MB) quando comparadas à pele normal (28,45 CL/ mm²; 2,50 CL/ mm de MB; 2,87 CL/mm de camada córnea; 0,04 CD dérmicas/ mm de MB). Houve correlação direta entre o número de CD dérmicas na lesão de PFE e a titulação de anticorpos séricos por IFI ($r=0,4779$, $p<0,05$), indicativo de que as CD dérmicas poderiam estar participando da patogênese do PFE. Poder-se-ia supor que as CD estariam transitando pela derme em direção ao linfonodo regional, exercendo função estimuladora de linfócitos T na indução da resposta imune e produção de auto-anticorpos.

SUMMARY

In order to contribute to the elucidation of pathophysiology of Endemic Pemphigus Foliaceus (EPF) titration of serum antibodies and quantification of Langerhans Cells (LC) and dermal dendritic cells (DC) in skin of patients with EPF were made. Blood and skin biopsies (lesional skin) of 22 EPF patients were collected and, in 13 of them, biopsies of normal sun-protected skin of non perilesional area were collected too. 13 patients had localized lesions and 9, generalized; 11 were in treatment. Control groups consisted of thoracic normal skin from 8 cadavers and 12 women submitted to breast plastic surgery. For indirect immunofluorescence (IFI), abdominal normal skin as substrate and anti-IgG were used. LC and dermal DC identification was done by immunohistochemistry with anti-CD1a antibody and quantification by morfometric analysis. It was found association between titration of serum antibodies by IFI and clinical form of EPF, with greater titration in the generalized one. LC number in lesion (60.18 LC/mm^2 , 5.00 LC/mm basement membrane (BM), 3.55 LC/mm stratum corneum) and normal skin of EPF patients (28.45 LC/mm^2 , 2.50 LC/mm BM, 2.87 LC/mm stratum corneum) was similar to LC number in skin of plastic surgery (72.35 LC/mm^2 , 4.53 LC/mm BM, 4.42 LC/mm stratum corneum) and cadaver controls (47.15 LC/mm^2 , 2.53 LC/mm BM, 2.42 LC/mm stratum corneum). Dermal DC number in lesional skin of EPF patients (0.98 DC/mm BM) was similar to the DC number of plastic surgery controls (0.48 DC/mm BM), but greater than DC number in cadaver controls (0.13 DC/mm BM). The ratio LC number/ dermal DC number was smaller in lesional EPF skin than in controls, confirming the greatest DC number in dermis. In the same patient, LC and dermal DC were in greater amounts in EPF lesional skin (61.50 LC/mm^2 , 5.49 LC/mm BM, 6.64 LC/mm stratum corneum, $0.86 \text{ dermal DC/mm}$ BM) than in normal skin (28.45 LC/mm^2 , 2.50 LC/mm BM, 2.87 LC/mm

stratum corneum, 0.04 dermal DC/ mm BM). It was found direct association between dermal DC number in lesional skin of EPF patients and titration of antibodies by IFI ($r=0.4779$, $p<0.05$), confirming that dermal DC could play an important role in EPF pathogenesis. It could be proposed that DC would be in transit through the dermis towards the regional lymph node, stimulating T lymphocytes to produce autoantibodies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANHALT, G. J.; KIM, S.; STANLEY, J. R.; KORMAN, N. J.; JABS, D. A.; KORY, M.; IZUMI, H.; RATRIE III, H.; MUTASIN, D.; ARISS-ABDO, L.; LABIB, R. S. Paraneoplastic Pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1729-1735, 1990.

AOYAMA, Y.; TSUJIMURA, Y.; FUNABASHI, M.; SATO, M.; KAMIYA, H.; KITAJIMA, Y. An experience for ELISA for desmoglein 1, suggesting a possible diagnostic help to determine the initial therapy for pemphigus foliaceus. **Eur. J. Dermatol.**, v. 10, n. 1, p. 18-21, 2000.

ARANHA-CAMPOS, J. **Pênfigo Foliáceo (fogo selvagem). Aspectos clínicos e epidemiológicos.** São Paulo: Edições Melhoramentos, 1942. 127p.

ASHWORTH, J.; BOOKER, J.; BREATHNACH, S. M. Effects of topical corticosteroid therapy on Langerhans cell antigen presenting function in human skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 118, p. 457-470, 1988.

ASHWORTH, J.; KAHAN, M. C.; BREATHNACH, S. M. Flow cytometric analysis and sorting of HLA-DR+CD1+ Langerhans cells. **Br. J. Dermatol.**, v.114, p. 11-18, 1989.

AUBOCK, J.; ROMANI, N.; GRUBAUER, G.; FRITSCH, P. HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 114, n. 4, p. 465-472, 1986.

BARRAVIERA, S. R. C. S.; DILLON, N. L.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, T. S.; CURI, P. R.; ALMEIDA, D. B. Cell and humoral immunity in endemic pemphigus foliaceus. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, p. 25-33, 1995.

- BELSITO, D. V.; FLOTTE, T. J.; LIM, H. W.; BAER, R. L.; THORBECKE, G. J.; GIGLI, I. Effect of glucocorticosteroids on epidermal Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 155, p. 291-302, 1982.
- BERMAN, B.; CHEN, V. L.; FRANCE, D. S.; DOTZ, W. I.; PETRONI, G. Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. **Br. J. Dermatol.**, v. 109, p. 553-558, 1983a.
- BERMAN, B.; FRANCE, D. S.; MARTINELLI, G. P.; HASS, A. Modulation of Expression of Epidermal Langerhans Cell Properties Following in situ Exposure to Glucocorticosteroids. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, p. 168-171, 1983b.
- BERNATECK, M.; JONAS, L.; DIEZEL, W. Histochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies on the action of glucocorticoids on epidermal Langerhans cells (ELC) of murine skin. **Acta Histochem. (Jena)**, v. 98, p. 101-106, 1996.
- BEUTNER, E. H.; JORDON, R. E. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 117, p. 505-510, 1964.
- BEUTNER, E. H.; PRIGENZI, L. S.; HALE, W.; LEME, C. A.; BIER, O. G. Immunofluorescent studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian Pemphigus Foliaceus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 127, n. 1, p. 81-86, 1968.
- BIEBER, T.; RING, J.; BRAUN-FALCO, O. Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 118, p. 383-392, 1988.
- BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. The Skin Immune System. Its cellular constituents and their interactions. **Immunol. Today**, v. 7, p. 235-240, 1986.

- BOS, J. D. The skin as an organ of immunity. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 107, supl. 1, p. 3-5, 1997.
- BREATHNACH, S. M. The Langerhans cells. **Br. J. Dermatol.**, v. 119, p. 463-469, 1988.
- CASTRO, R. M.; PROENÇA, N. G. Semelhanças e diferenças entre o Fogo Selvagem e o Pênfigo Foliáceo de Cazenave. **An. Bras. Dermatol.**, v. 58, n. 3, p. 137-139, 1983.
- CERNA, M.; FERNANDEZ-VINA, M.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; DIAZ, L. A.; STASTNY, P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens**, v. 42, p. 138-140, 1993.
- CHIOSSI, M. P. V.; ROSELINO, A. M. F. Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): a series from the Northeastern region of the State of São Paulo, Brazil, 1973-1998. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** (*in press*).
- CHEN, H.; YUAN, J.; WANG, Y.; SILVERS, W. K. Distribution of ATPase-positive Langerhans cells in normal adult human skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 113, n. 6, p. 707-711, 1985.
- CRUCHLEY, A. T.; WILLIAMS, D. M.; FARTHING, P. M.; SPEIGHT, P. M.; LESCH, C. A.; SQUIER, C. A. Langerhans cells density in normal human oral mucosa and skin: relationship to age, smoking and alcohol consumption. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 23, p. 55-59, 1994.
- CUNHA, P. R. **Estudo soro-epidemiológico em foco de pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem) no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1988. 75p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- CUNHA, P. R.; FOCACCIA, R. R.; DIAZ, L. A. Evolution of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) after HIV-1 infection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 32, n. 5, p. 809-811, 1995.
- D'AURIA, L.; BONIFATI, C.; MUSSI, A.; D'AGOSTO, G.; DE SIMONE, C.; GIACALONE, B.; FERRARO, C.; AMEGLIO, F. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 8, n. 4, p. 383-387, 1997.
- DE JONG, M. C. J. M.; BLANKEN, R.; NANNINGA, J.; VADER, P. C. V. V.; POPPEMA, S. Defined in situ enumeration of T6 and HLA-DR expressing epidermal Langerhans cells: morphologic and methodologic aspects. **J. Invest. Dermatol.**, v. 87, p. 698-702, 1986.
- DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; HANS, G. F.; BORGES, P.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPELL, I.; LABID, R. S.; ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 20, p. 657-669, 1989a.
- DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; HANS, G. F.; BORGES, P.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPELL, I.; LABID, R. S.; ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). II. Current and Historic Epidemiologic Studies. **J. Invest. Dermatol.**, v. 92, p. 4-12, 1989b.
- DRIJKONINGEN, M.; WOLF-PEETER, C.; OORD VAN DEN, J. J.; DEGREEF, H.; DESMET, V. Expression of HLA-DR and T6 Antigens on Keratinocytes and Dendritic Cells. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 110, p. 321-325, 1986.

- EATON, D. P.; DIAZ, L. A.; HANS-FILHO, G.; SANTOS, V.; AOKI, V.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E. A.; SAMPAIO, S. A.; GOTTLIEB, M. S.; GIUDICE, G. J.; LOPEZ, A. L.; CUPP, E. W. and the Cooperative Group for Fogo Selvagem Research. Comparison of Black Fly Species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian Reservation with a High Prevalence of Fogo Selvagem to Neighboring Disease-Free Sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **J. Med. Entom.**, v. 35, n. 2, p. 120-131, 1998.
- EMTESTAM, L.; HOVMARK, A.; LINDBERG, M.; ASBRINK, E. Human epidermal Langerhans' cells in bullous pemphigoid. **Acta Derm. Venereol. (Stockh)**, v. 67, p. 529-532, 1987.
- ESPAÑA, A.; DIAZ, L. A.; MASCARÓ Jr., J. M.; GIUDICE, G. J.; FAIRLEY, J. A.; TILL, G. O.; LIU, Z. Mechanisms of Acantholysis in Pemphigus Foliaceus. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 85, n. 1, p. 83-89, 1997.
- FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; ROCHA ALVAREZ, R.; DIAZ, L. A.; MARTINS DE CASTRO, R.; ROITMAN, I.; PARREIRAS, R. M.; RAICK, A. N. Imunofluorescência indireta no pênfigo foliáceo endêmico. Contribuição para sua padronização. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 31, p. 158-168, 1989.
- FRIEDMANN, P. S. Disappearance of epidermal Langerhans cells during PUVA therapy. **Br. J. Dermatol.**, v. 105, p. 219-221, 1981.
- GALVÃO, M. M.; SOTTO, M. N.; KIHARA, S. M.; RIVITTI, E. A.; SABBAGA, E. Lymphocyte subsets and Langerhans cells in sun-protected and sun-exposed skin of immunosuppressed renal allografts recipients. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 38, p. 38-44, 1998.
- GARIOCH, J. J.; BAKER, B. S.; LEONARD, J. N.; FRY, L. T lymphocytes in lesional skin of patients with dermatitis herpetiformis. **Br. J. Dermatol.**, v. 131, n. 6, p. 822-826, 1994.

- GIACALONE, B.; D'AURIA, L.; BONIFATI, C.; FERRARO, C.; RICCARDI, E.; MUSSI, A.; D'AGOSTO, G.; CORDIALI-FEI, P.; AMEGLIO, F. Decreased interleukin-7 and transforming growth factor-beta 1 levels in blister fluids as compared to the respective serum levels in patients with bullous pemphigoid. Opposite behavior of TNF-alpha, interleukin-4 and interleukin-10. **Exp. Dermatol.**, v. 7, n. 4, p. 157-161, 1998.
- GILCHREST, B. A.; MURPHY, G. F.; SOTER, N. A. Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 79, p. 85-88, 1982.
- GOODMAN, H. Nikolsky sign. **Arch. Dermatol. Syphilol.**, v. 68, p. 334-335, 1953.
- GUERRA, H. A.; REIS, A. P.; GUERRA, M. V. N. T and B lymphocytes in South American pemphigus foliaceus. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 23, p. 477-480, 1976.
- HANS-FILHO, G.; SANTOS, V.; KATAYAMA, J. H.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SAMPAIO, S. A.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; EATON, D. P.; LOPEZ, A. L.; HOFFMAN, R. G.; FAIRLEY, J. A.; GIUDICE, G. J.; DIAZ, L. A. and the Cooperative Group for Fogo Selvagem Research. An active focus of high prevalence of Fogo Selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. **J. Invest. Dermatol.**, v. 107, p. 68-75, 1996.
- HARMAN, K. E.; GRATIAN, M. J.; BHOGAL, B. S.; CHALLACOMBE, S. J.; BLACK, M. M. The use of two substrates to improve the sensitivity of indirect immunofluorescence in the diagnosis of pemphigus. **Br. J. Dermatol.**, v. 142, n. 1, p. 1135-1139, 2000.
- HARRIST, T. J.; MUHLBAUER, J. E.; MURPHY, G. F.; MIHM Jr., M. C.; BHAN, A. K. T6 is superior to Ia (HLA-DR) as a marker for Langerhans cells and indeterminate cells in normal epidermis: a monoclonal antibody study. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, p. 100-103, 1983.

- HERTL, M.; AMAGAI, M.; SUNDARAM, H. Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. **J. Invest. Dermatol.**, v. 110, p. 388-392, 1998.
- HOGAN, A. D.; BURKS, A. W. Epidermal Langerhans' cells and their function in the skin immune system. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 75, p. 5-10, 1995.
- HORTON, J.J.; ALLEN, M.H.; MacDONALD, D.M. An assessment of Langerhans cell quantification in tissue sections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 11, p. 591-593, 1984.
- HSU, S.-M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 577-580, 1981.
- INAOKI, M.; TAKEHARA, K. Increased serum levels of interleukin (IL)-5, IL-6 and IL-8 in bullous pemphigoid. **J. Dermatol. Sci.**, v. 16, n. 2, p. 152-157, 1998.
- JUDD, K. P.; LEVER, W. F. Correlation of antibodies in skin and serum with disease severity in pemphigus. **Arch. Dermatol.**, v. 115, p. 428-432, 1979.
- KAWANA, S.; DIAZ, L. A.; RIVITTI, E. A.; GEOGHEGAN, W. D.; JORDON, R. E. Complement fixation by Brazilian Pemphigus Foliaceus autoantibodies. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 71, p. 464-469, 1988.
- KOULU, L.; JANSÉN, C. T. Epidermal Langerhans cell number and morphology during oral retinoid treatment. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 272, n. 1-2, p. 135-137, 1982.
- KOULU, L.; KUSUMI, A.; STEINBERG, M. S.; KLAUS-KOVTUN, V.; STANLEY, J. R. Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus. **J. Exp. Med.**, v. 160, n. 5, p. 1509-1518, 1984.

LAPPIN, M. B.; KIMBER, I.; NORVAL, M. The role of dendritic cells in cutaneous immunity. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 288, p. 109-121, 1996.

LERNER, L. H.; ROSELINO, A.; QURESHI, A. A.; LERNER, E. A. Nitric Oxide and Cutaneous Graft *Versus* Host Disease. **J. Invest. Dermatol.**, v. 114, n. 4, p. 836, 2000a.

LERNER, L. H.; QURESHI, A. A.; REDDY, B. V.; LERNER, E. A. Nitric Oxide Synthase in Toxic Epidermal Necrolysis and Stevens-Johnson Syndrome. **J. Invest. Dermatol.**, v. 114, p. 196-199, 2000b.

LEVER, W. F. Pemphigus. **Medicine**, v. 32, p. 1-123, 1953.

LIN, M.S.; FU, C.L.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E. A.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; LAZARO, A. M.; GIUDICE, G. J.; STASTNY, P.; DIAZ, L. A. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 2, p. 207-213, 2000.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; FRIEDMAN, H.; MARTINS, C. R.; SANCHES JÚNIOR, J. A.; CUNHA, P. R.; HOFFMAN, R. G.; DIAZ, L. A. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). **J. Invest. Dermatol.**, v. 98, p. 847-850, 1992.

MACATONIA, S. E.; HOSKEN, N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; CHYI-SONG, H.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic Cells Produce IL-12 and Direct the Development of Th1 Cells from Naive CD4⁺ T Cells. **J. Immunol.**, v. 154, p. 5071-5079, 1995.

MASHKILLEYSON, N.; KONTTINEN, Y. T.; VISA, K. Local involvement of antigen-presenting cells and activated T cells in perilesional and clinically uninvolved skin in pemphigus vulgaris. **Acta. Derm. Venereol. (Stockh)**, v. 69, p. 424-428, 1989.

- MATIS, W. L.; ANHALT, G. J.; DIAZ, L. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; BERGER, R. S. Calcium enhances the sensitivity of immunofluorescence for pemphigus antibodies. **J. Invest. Dermatol.**, v. 89, p. 302-304, 1987.
- METTANG, T.; FRITZ, P.; WEBER, J.; MACHLEIDT, C.; HÜBEL, E.; KIEFER, T.; KUHLMANN, U. Epidermal Langerhans Cells in Uremic Patients on Hemodialysis or Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. **Nephron**, v. 65, n. 2, p. 278-283, 1993.
- MODLIN, R. L.; ROWDEN, G.; TAYLOR, C. R.; REA, T. H. Comparison of S-100 and OKT6 antisera in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 83, n. 3, p. 206-209, 1984.
- MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; DIAZ, L. A.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; ALVAREZ, R. R.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; STASTNY, P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, v. 33, n. 5-6, p. 388-391, 1991.
- MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; LAZARO, A.; DIAZ, L. A.; HANS-FILHO, G.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E. A.; AOKI, V.; SAMPAIO, S. A.; STASTNY, P.; MORAES, J. R. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 35-40, 1997.
- NANDWANI, R.; GAZZARD, B. G.; BARTON, S. E.; HAWKINS, D. A.; ZEMELMAN, V.; STAUGHTON, R. C. D. Does HIV disease progression influence epidermal Langerhans cell density? **Br. J. Dermatol.**, v. 134, p. 1087-1092, 1996.
- NESTLE, F. O.; NICKOLOFF, B. J. Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 378, p. 111-116, 1995.
- NESTOR, M. S.; COCHRAN, A. J.; AHMED, A. R. Mononuclear cell infiltrates in bullous disease. **J. Invest. Dermatol.**, v. 88, n. 2, p. 172-175, 1987.

- PETZL-ERLER, M. L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, p. 408-414, 1988.
- PICUT, C.; MEUNIER, J.; LEE, C.; LEWIS, R. Expression of HLA-DR and OKT6 antigens on keratinocytes and dendritic cells in pemphigus. **Arch. Derm. Res.**, v. 279, p. 516-520, 1987.
- PROENÇA, N.; CASTRO, R. M. Geografia Médica do Pênfigo Foliáceo Sul-Americano. **An. Bras. Dermatol.**, v. 46, p. 253-260, 1971.
- PROENÇA, N. G.; RIBEIRO, A. G. Aspectos Epidemiológicos do Pênfigo Foliáceo no Brasil. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 22, n. 8, p. 281-284, 1976.
- PROENÇA, N. G. Declínio do pênfigo foliáceo no Estado de São Paulo (Brasil). **Rev. Paul. Med.**, v. 89, p. 97-100, 1977.
- QURESHI, A. A.; HOSOI, J.; XU, S.; TAKASHIMA, A.; GRANSTEIN, R. D. ; LERNER, E. A. Langerhans cells express inducible nitric oxide synthase and produce nitric oxide. **J. Invest. Dermatol.**, v. 107, p. 815-821, 1996.
- RICO, M. J.; BENNING, C.; WEINGART, E. S.; STREILEIN, R. D.; HALL III, R. P. Characterization of skin cytokines in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. **Br. J. Dermatol.**, v. 140, p. 1079-1086, 1999.
- RIVITTI, E. A.; SANCHES, J. A.; MIYAUCHI, L. M.; SAMPAIO, S. A. P.; AOKI, V.; DIAZ, L. A. and The Cooperative Group for Fogo Selvagem Research. Pemphigus foliaceus antibodies bind both epidermis and squamous mucosal epithelium, but tissue

injury is detected only in the epidermis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. 954-958, 1994.

ROCHA-ALVAREZ, R.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; SOUZA-AGUIAR, L.; MARTINS-CASTRO, R.; DIAZ, L. A. Pregnant women with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) give birth to disease-free babies. **J. Invest. Dermatol.**, v. 99, n. 1, p. 78-82, 1992.

ROCK, B.; MARTINS, C. R.; THEOFILOPOULOS, A. N.; BALDERAS, R. S.; ANHALT, G. J.; LABIB, R. S.; FUTAMURA, S.; RIVITI, E. A.; DIAZ, L. A. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 22, p. 1463-1469, 1989.

ROMAGNANI, S. Induction of Th1 and Th2 responses: a Key role for the "natural" immune response? **Immunol. Today**, v. 13, n. 10, p. 379-381, 1992.

ROSCOE, J. T.; DIAZ, L.; SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; LABIB, R. S.; TAKAHASHI, Y.; PATEL, H.; ANHALT, G. J. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. **J. Invest. Dermatol.**, v. 85, n. 6, p. 538-541, 1985.

ROSELINO, A. M. F.; ALMEIDA, A. M. Surto de pênfigo foliáceo endêmico em instituição para menores em Batatais, Estado de São Paulo, Brasil, 1988-1990. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 28, n. 1, p. 44-50, 1995.

ROSELINO, A. M. F.; DEGHAIDE, N. H. S.; DONADI, E. A. HLA-A69 e HLA DRB1*01 em pênfigo foliáceo. **Anais do 53º Congresso Brasileiro de Dermatologia, Blumenau, SC**, p. 12, 5 a 9 de setembro de 1998.

SANTI, C. G. **Caracterização imunopatológica da resposta tecidual no pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)**. São Paulo, 1997, 150p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- SANTOS, S. N. M. B. **Perfil evolutivo das subclasses de imunoglobulinas gama em pacientes de Pênfigo Foliáceo Endêmico**. Rio de Janeiro, 1996. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SARTORI-BARRAVIERA, S. R. C.; DILLON, N. L. Pênfigo Foliáceo no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP. **An. Bras. Dermatol.**, v. 72, n. 6, p. 533-537, 1997.
- SHIRAKATA, Y.; AMAGAI, M.; HANAKAWA, Y.; NISHIKAWA, T.; HASHIMOTO, K. Lack of mucosal involvement in Pemphigus Foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. **J. Invest. Dermatol.**, v. 110, p. 76-78, 1998.
- SISON-FONACIER, L.; BYSTRYN, J. C. Regional variations in antigenic properties of skin. **J. Exp. Med.**, v. 164, p. 2125-2130, 1986.
- SOTTO, M. N.; SHIMIZU, S. H.; COSTA, J. M.; BRITO, T. South American pemphigus foliaceus: electron microscopy and immunoelectron localization of bound immunoglobulin in the skin and oral mucosa. **Br. J. Dermatol.**, v. 102, p. 521-527, 1980.
- SQUIQUERA, H. L.; DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; LAVRADO, C.; BORGES, P.; FRIEDMAN, H.; LABIB, R. S.; ANHALT, G. J. and the Cooperative Group for Fogo Selvagem Research. Serologic abnormalities in patients with Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem), their relatives, and normal donors from endemic and non-endemic areas of Brazil. **J. Invest. Dermatol.**, v. 91, p. 189-191, 1988.
- STANLEY, J. R.; KLAUS-KOVTUN, V.; SAMPAIO, S. A. P. Antigenic specificity of Fogo Selvagem autoantibodies is similar to North American Pemphigus Foliaceus and distinct from Pemphigus Vulgaris autoantibodies. **J. Invest. Dermatol.**, v. 87, p. 197-201, 1986.

- STINGL, G.; WOLFF SCHREINER, E. C.; PICHLER, W. J.; GSCHNAIT, F.; KNAPP, W.; WOLFF, K. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. **Nature**, v. 268, n. 5617, p. 245-246, 1977.
- STOLL, S.; JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; MÜLLER, G.; YAMAUCHI, H.; KURIMOTO, M.; KNOP, J.; ENK, A. H. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 3231-3239, 1998.
- TEUNISSEN, M. B. M. Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells. **Histochem. J.**, v. 24, p. 697-716, 1992.
- THIERS, B. H.; MAIZE, J. C.; SPICER, S. S.; CANTOR, A. B. The effect of aging and chronic sun exposure on human Langerhans cell populations. **J. Invest. Dermatol.**, v. 82, p. 223-226, 1984.
- TONG, Y.; TUCKER, S. B. Normal human skin lymphocytic and Langerhans' cell responses to intradermal interferon alpha-2beta injections. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, n. 1, p. 23-27, 1993.
- VIEIRA, J.P. **Novas contribuições ao estudo do pênfigo foliáceo (fogo selvagem) no Estado de São Paulo**. São Paulo: Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, 1940. 174p.
- VIEIRA, J.P. **Novas contribuições ao estudo do pênfigo foliáceo (fogo selvagem) no Estado de São Paulo**. São Paulo: Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, 1942. 170p.
- VIEIRA, J.P. **Considerações sobre o pênfigo foliáceo no Brasil**. São Paulo: Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, 1948. 156p.

- WALKER, D. C.; KOLAR, K. A.; HEBERT, A. A.; JORDON, R. E. Neonatal Pemphigus Foliaceus. **Arch. Dermatol.**, v. 131, p. 1308-1311, 1995.
- WARREN, S. J.; LIN, M. S.; GIUDICE, G. J.; HOFFMANN, R. G.; HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SANTOS, V.; DIAZ, L. A. and the Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 1, p. 23-30, 2000.
- WOLFF, K. The Langerhans cell. **Curr. Probl. Dermatol.**, v. 4, p. 79-145, 1972.
- WOLFF, K.; SCHREINER, E. Ultrastructural localization of Pemphigus autoantibodies within the epidermis. **Nature**, v. 229, n. 5279, p. 59-61, 1971.
- ZEOTI, D. M.; FIGUEIREDO, J. F.; CHIOSSI, M. P.; ROSELINO, A. M. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 9, p. 1065-1068, 2000.
- ZILLIKENS, D.; AMBACH, A.; ZENTNER, A.; DUMMER, R.; SCHÜSSLER, M.; BURG, G.; BRÖCKER, E. B. Evidence for cell-mediated immune mechanisms in the pathology of pemphigus. **Br. J. Dermatol.**, v. 128, p. 636-643, 1993.

APÊNDICE

Tabela 1: Dados gerais dos doentes com PFE, “grupo retrospectivo”

Número de ordem	Registro	Data do primeiro atendimento	Número do soro	Data da coleta do soro	Número da biopsia	Data da biopsia	Intervalo soro-biopsia (dias)	Data IFI	Intervalo coleta soro-IFI
1	0324628	23/04/93	04	23/04/93	2594/93	26/04/93	3	24/03/99	6anos1mês
2	0364609	16/01/95	31	21/02/95	283/95	18/01/95	35	30/03/99	4anos1mês
3	0366590	20/02/95	32	21/02/95	1154/95	20/02/95	1	30/03/99	4anos1mês
4	0390947	05/02/96	49	05/02/96	817/96	05/02/96	0	23/03/99	3anos1mês
5	0431913	25/08/97	89	02/09/97	7583/97	25/08/97	9	23/03/99	1ano7meses
6	0442595	16/01/98	97	20/01/98	370/98	16/01/98	4	30/03/99	1ano2meses
7	0447219	16/03/98	102	20/03/98	2262/98	17/03/98	3	02/03/99	1ano
8	0451668	13/05/98	105	18/05/98	4673/98	22/05/98	4	10/03/99	10meses
9	0456175	13/07/98	114	21/08/98	Sem reg.	21/08/98	0	09/03/99	8meses

Tabela 2: Dados gerais dos doentes com PFE, “grupo prospectivo”

Número de ordem	Registro	Data do primeiro atendimento	Número do soro	Data da coleta do soro	Número da biopsia	Local da biopsia: lesão/normal	Data IFI	Intervalo coleta soro-IFI
10	0276764	24/06/91	118	02/12/98	11535/98	Tórax post/ tórax post	31/03/99	4meses
11	0409632	07/10/96	119	02/12/98	11493/98	Abdome/coxa	06/04/99	4meses
12	0467329	14/12/98	120	14/12/98	12112/98	Tórax ant/ abdome	06/04/99	4meses
13	0252178	05/06/90	121	14/12/98	12130/98	Tórax post/abdome	06/04/99	4meses
14	0398026	27/05/96	125	01/02/99	992/99	Tórax post/ nádega	06/04/99	2meses
15	0426006	03/06/97	126	10/02/99	1392/99	Abdome/ coxa	12/04/99	2meses
16	0411963	11/11/96	130	01/03/99	1802/99	Tórax post/ nádega	13/04/99	1mês
17	0163378	13/01/86	134	15/03/99	2373/99	Tórax post/ nádega	13/04/99	1mês
18	0398955	13/05/96	135	15/03/99	2372/99	Tórax post/ nádega	13/04/99	1mês
19	0474702	29/03/99	136	29/03/99	2942/99	Braço/ nádega	13/04/99	1mês
20	0312904	06/04/93	137	29/03/99	2943/99	Tórax post/ tórax post	14/04/99	1mês
21	0475130	06/04/99	145	14/06/99	5727/99	Tórax post/ nádega	10/08/99	2meses
22	0480799	21/06/99	146	28/06/99	6208/99	Tórax post/ tórax post	10/08/99	1mês

Tabela 3: Distribuição dos casos com PFE “grupo retrospectivo” quanto aos dados demográficos, HC-FMRP-USP,1993-1999.

Número de ordem	Idade	Sexo	Raça	Procedência	Profissão	Forma clínica	Tempo de evolução	Medicação	Tempo de tratamento
1	59	Fem	B	Matão (SP) - rural	doméstica	localizada	8 meses	-	-
2	10	Fem	B	Batatais (SP)	estudante	generalizada	3 meses	Prednisona-15 mg	2 dias
3	18	Fem	B	Batatais (SP) - urbana	estudante	localizada	1 ano	-	-
4	54	Fem	B	Mineiros (GO)	lavradora	localizada	2 meses	Prednisona-20 mg	15 dias
5	34	Fem	B	Batatais (SP)	manicure	localizada	4 meses	-	-
6	9	Mas	B	Buritizal (SP) - rural	estudante	leneralizada	2 meses	-	-
7	71	Mas	B	Viradouro (SP) - urbana	lavrador	leneralizada	3 meses	-	-
8	46	Mas	B	Querência do Norte (MT) - rural	lavrador	leneralizada	2 anos	-	-
9	17	Mas	P	São José da Bela Vista (SP) - urbana	lavrador	leneralizada	3 meses	Prednisona-60mg	1 mês

Fem = feminino, Mas = masculino,

B = branco, P = pardo, N = negro,

-: sem tratamento,

tempo de evolução = tempo de doença até biopsia de pele,

tempo de tratamento = tempo de uso da medicação nesta dose até a biopsia.

Tabela 4: Distribuição dos casos de PFE “grupo prospectivo” quanto aos dados demográficos, HC-FMRP-USP, 1998-1999.

Nº de ordem	Idade	Sexo	Raça	Procedência	Profissão	Forma Clínica	Tempo de evolução	Medicação	Tempo de tratamento
10	39	Mas	B	Matão (SP) - urbana	lavrador	generalizada	11 anos	Decadron-1 ampola	1 mês
11	20	Fem	B	Altinópolis (SP) - rural	estudante	localizada	2 anos	-	-
12	52	Mas	P	Restinga (SP) – rural	lavrador	localizada	1 ano	sem corticoterapia há 1 mês	-
13	24	Fem	B	Sales Oliveira (SP) – rural	doméstica	localizada	11 anos	sem corticoterapia há 3 meses	-
14	26	Mas	P	Descalvado (SP)	serviços gerais	localizada	10 anos	Prednisona- 40 mg Cloroquina- 250 mg	2anos4meses
15	74	Fem	B	Ribeirão Preto (SP) – urbana	aposentada	generalizada	1ano10 meses	Prednisona- 20 mg	10 meses
16	47	Mas	B	Juruaia (MG)	lavrador	localizada	2anos4meses	Prednisona- 10 mg Cloroquina- 250 mg	2 meses 2anos4meses
17	46	Fem	B	Guardinha (MG) - rural	doméstica	localizada	25 anos	Prednisona- 10 mg	2 meses
18	64	Mas	B	Franca (SP) – rural	aposentado	generalizada	15 anos	Prednisona- 30mg	5 meses
19	65	Mas	B	Capitinga (MG) - rural	aposentado	generalizada	6 meses	-	-
20	73	Fem	B	Vargem Bonita (MG) – urbana	doméstica	localizada	10 anos	Prednisona- 5 mg Cloroquina- 250 mg	
21	40	Mas	B	São Sebastião do Paraíso (MG)	eletricista	localizada	2anos2 meses	Prednisona- 20 mg Cloroquina- 250 mg/d	1 mês
22	18	Mas	N	Cajuru (SP) – rural	lavrador	localizada	3 meses	-	-

Fem = feminino, Mas = masculino,

B = branco, P = pardo, N = negro,

-: sem tratamento,

tempo de evolução = tempo de doença até biopsia de pele,

tempo de tratamento = tempo de uso da medicação nesta dose até a biopsia.

Tabela 5: Dados gerais do grupo controle - cadáver

Identificação	Nº da necropsia	Registro HCFMRP-USP	Data do óbito	Horário do óbito	Horário da necrópsia	Intervalo óbito-necrópsia
PNC- 1	A 270/99	-	26/04/99	13:50	14:00	10 min
PNC- 2	A 271/99	-	26/04/99	00:55	9:20	8:25
PNC- 3	A 273/99	-	28/04/99	9:00	9:30	30 min
PNC- 4	A 276/99	-	29/04/99	8:00	9:00	1:00
PNC- 5	HC 446/99	0477287J	01/05/99	4:20	9:30	5:10
PNC- 6	HC 448/99	0476572K	01/05/99	17:00	20:45	3:45
PNC- 7	HC 450/99	0072133I	01/05/99	20:30	23:30	3:00
PNC- 8	HC 457/99	0322883	04/05/99	23:05	2:20	2:15

PNC = pele normal de cadáver

Tabela 6: Dados gerais do grupo controle - cirurgia plástica

	Iniciais	Registro HCFMRP-USP	Data da cirurgia
PN 1	AAM	006407B	26/06/99
PN 2	EL	0132583F	26/06/99
PN 3	DAR	0465587C	26/06/99
PN 4	JDFP	0425463H	26/06/99
PN 5	LASG	056796K	26/06/99
PN 6	MADB	0463086A	26/06/99
PN 7	MTDT	0437162E	26/06/99
PN 8	IFN	0457999K	26/06/99
PN 9	MGON	016228H	26/06/99
PN 10	ATO	0202213F	26/06/99
PN 11	ADS	0334783G	26/06/99
PN 12	BFS	059946C	26/06/99

PN = pele normal

Tabela 7: Resumo dos resultados estatísticos da quantificação de CL nos diferentes grupos estudados, segundo diferentes medidas

	cirurgia plástica	cadáver	paciente- pele normal	paciente- pele lesada
mm ²	↑↑	n.s.	↑	n.s.
mm de membrana basal	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mm de camada córnea	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = não segnificante

↑ = aumentada

Tabela 8: Resumo dos resultados estatísticos da quantificação de CD dérmicas nos diferentes grupos estudados

	cirurgia plástica	cadáver	paciente- pele normal	paciente- pele lesada
Mm de membrana basal	↑↑	↑	↑	↑↑↑

↑ = aumentada

Tabela 9: Resumo dos resultados estatísticos da quantificação de CL e CD dérmicas no mesmo paciente

		normal	lesão
epiderme	mm ²	↑	↑↑
	mm de membrana basal	n.s.	n.s.
	mm de camada córnea	↑	↑↑
Derme	mm de membrana basal	↑	↑↑↑

n.s.: = não signficante

↑ = aumentada