FERNANDA LAGO

**Perfil imunoistoquímico de linfócitos T regulatórios
no pênfigo foliáceo endêmico através da
expressão do marcador Foxp3**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Aoki

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lago, Fernanda

Perfil imunoistoquímico de linfócitos T regulatórios no pênfigo foliáceo
endêmico através da expressão do marcador Foxp3 / Fernanda Lago.-- São Paulo,
2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientadora: Valéria Aoki.

Descritores: 1.Auto-imunidade 2.Pênfigo 3.Foxp3 4.Linfócitos T reguladores
5.Tolerância imunológica

USP/FM/DBD-190/11

Dedicatória

À minha mãe Dulce Elena, por ter me proporcionado uma criação primorosa baseada no amor, sendo esta o reflexo de tudo que tenho e sou hoje. Todas as minhas homenagens.

Ao meu pai Nelso, por toda sua dedicação e genialidade, transmitindo-me diariamente lições de amor, humanidade e Medicina. Toda a minha admiração.

Ao meu esposo Alex, meu companheiro e amigo, por todo seu amor e cumplicidade, dividindo comigo todos os momentos, todas as escolhas, todos os caminhos. Todo o meu amor.

Agradecimentos especiais

À minha orientadora Prof. Dra. Valéria Aoki, pelo carinho, pelos preciosos ensinamentos e pela imensa oportunidade de ter trabalhado ao seu lado. Brilhante médica e pesquisadora, pessoa sensível e humana, sempre demonstrou amizade e me conduziu com muita sabedoria e incentivo ao longo destes quatro anos.

À Prof. Dra. Mirian Nacagami Sotto por sua valiosa colaboração e sugestões em todas as fases da realização deste estudo. Médica exemplar, exímia pesquisadora e didata por vocação, agradeço pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

À Ana Maria Gonçalves Silva, por sua imensa dedicação, competência e comprometimento com este estudo. Bióloga determinada, me recebeu com muito carinho e amizade, auxiliando e buscando soluções nas horas mais críticas, agradeço por seus conselhos, seu otimismo e sua imprescindível colaboração.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, que com boa disposição, entusiasmo e brilhantismo, me auxiliou na concretização de etapas cruciais deste estudo.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Thales de Brito, pelo apoio durante a realização deste estudo em seu laboratório.

Às Profs Dras. Celina Wakisaka Maruta e Claudia Giuli Santi, pela amizade e acolhida no Ambulatório de Doenças Vésico-Bolhosas Auto-Imunes do HCFMUSP, permitindo, assim, a idealização deste projeto.

Aos Profs. Drs. José Antonio Sanches Junior, Maria Notomi Sato e Vitor Manoel Silva dos Reis pelo incentivo na jornada da pós-graduação e pelas significantes contribuições durante a banca do exame de qualificação.

Aos Profs. Drs. Evandro Rivitti e Cyro Festa Neto, demais médicos e funcionários do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, pelo apoio e amizade ao longo de toda Pós-Graduação.

Ao biomédico Wellington Luiz Ferreira da Silva, pela dedicação, amizade e espírito coletivo demonstrados durante a etapa de documentação e análise de imagens deste estudo.

Aos amigos Alexandre, Eliete e Lígia, do Laboratório de Imunopatologia Cutânea do HCFMUSP, pelo auxílio e por terem me recebido com imenso

carinho em seu ambiente de trabalho, tornando mais alegre e agradável esta difícil jornada.

Às queridas Clarice, Cristina e Fátima, do Instituto de Medicina Tropical, pela amizade, pelas valiosas conversas e pelo apoio nos momentos críticos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido ao programa de Doutorado.

Ao CNPQ, por ter custeado todo este projeto de pesquisa.

“Follow your bliss and the universe will open
doors for you where there were only walls.”

Joseph Campbell

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Organização do Sistema Imunológico Humano: três níveis de defesa do hospedeiro.....	2
1.1.1	Barreiras anatômicas e fisiológicas	2
1.1.2	Imunidade inata	2
1.1.3	Imunidade adaptativa	4
1.2	Os linfócitos T regulatórios.....	6
1.3	SALT	14
1.4	Imunovigilância cutânea.....	16
1.5	Pênfigos	18
1.5.1	Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE) ou Fogo Selvagem.....	19
1.5.2	Pênfigo Vulgar (PV)	21
1.5.3	Imunopatologia dos Pênfigos	22
1.5.4	O papel dos linfócitos T regulatórios nos pênfigos	24
2	Justificativa e Objetivos.....	27
2.1	Justificativa.....	28
2.2	Objetivos	28
2.2.1	Objetivos Gerais	28
2.2.2	Objetivos específicos.....	29
3	Métodos.....	30
3.1	Casuística	31
3.1.1	Imunomarcção com anti-Foxp3	36
3.1.2	Dupla imunomarcção com anti-CD4/anti-Foxp3	38
3.1.3	Dupla imunomarcção com anti-CD25/anti-Foxp3	40
3.2	Contagem dos linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	42
3.3	Estatística.....	48

4	Resultados	49
4.1	Dados Clínicos e Demográficos	50
4.2	Linfócitos imunomarcados na epiderme.....	54
4.2.1	Epiderme – Linfócitos Foxp3 ⁺	54
4.2.2	Epiderme – Linfócitos CD25 ⁺	54
4.2.3	Epiderme – Linfócitos CD4 ⁺	54
4.2.4	Epiderme – Dupla marcação	55
4.3	Linfócitos imunomarcados na derme	57
4.3.1	Derme – Linfócitos Foxp3 ⁺	57
4.3.2	Derme – Linfócitos CD25 ⁺	57
4.3.3	Derme – Linfócitos CD4 ⁺	57
4.3.4	Derme – Dupla marcação.....	58
4.4	Expressão linfocitária , distribuição e controle da doença	60
5	Discussão.....	62
6	Conclusões	70
7	Anexos.....	72
8	Referências	77
	Apêndice	

Lista de abreviaturas

ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i> (Análise de variância)
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
C3	Fração 3 do complemento
CE	Corticosteróide
CCR4	<i>C-C chemokine receptor type 4</i>
CCR6	<i>C-C chemokine receptor type 6</i>
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD3	<i>Cluster Differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster Differentiation 8</i>
CD25	<i>Cluster Differentiation 25</i>
CD34	<i>Cluster Differentiation 34</i>
CD45RO	<i>Cluster Differentiation 45RO</i>
CD62L	<i>L-Selectin</i> (L-Selectina)
CD103	<i>Cluster Differentiation 103</i>
CD122	<i>Cluster Differentiation 122</i>
CD134	<i>Cluster Differentiation 134</i>
CD152	<i>Cluster Differentiation 152</i>
CLA	<i>Cutaneous Lymphocyte-associated antigen</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
Dsg1	Desmogleína 1

Dsg3	Desmogleína
EC	Ectodomínio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPF	<i>Endemic pemphigus foliaceus</i>
et. al.	e outros
Foxp3	<i>Forkhead box p3</i>
GATA3	Fator de transcrição GATA3
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
GlyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- α	Interferon-Alfa
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPEX	<i>Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-linked</i>
LB	Linfócito B
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	Linfócito T
LT reg	Linfócito T regulatório
MAdCAM-1	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1</i>

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de histocompatibilidade)
MiRNA	<i>microRNA</i>
Mtor	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OX40	CD134
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PF	Pênfigo Foliáceo
PFE	Pênfigo Foliáceo Endêmico
PV	Pênfigo Vulgar
Runx1	<i>Runt-related Transcriptional Factor 1</i>
SALT	<i>Skin Associated Lymphoid Tissue</i>
SIS	<i>Skin Immune System</i>
SMAD	<i>Transcriptional Activator of TGFβ</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF- β	<i>Tumor growth factor</i>
Tr1	Linfócitos T regulatórios do tipo 1
Th	Linfócito T <i>helper</i>

Lista de Símbolos

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
=	Igual
$\pm$	Mais ou menos
<	Menor
$\leq$	Menor ou igual a
x	Multiplicação
%	Porcento
kDa	QuiloDalton
μm	Micrômetro
mg	Miligrama
mmol	Milimolar
n	Tamanho
r	Coeficiente de correlação

Lista de Figuras

Figura 1.	Linfócitos T regulatórios naturais e induzidos	8
Figura 2.	Estabilidade <i>versus</i> instabilidade da expressão de Foxp3.....	10
Figura 3.	Diferentes classes dos linfócitos T regulatórios	14
Figura 4.	Envolvimento dos linfócitos T na patogênese do PV	25
Figura 5.	Focos endêmicos do PFE no território brasileiro	32
Figura 6.	Pacientes com a forma localizada do PFE	34
Figura 7.	Paciente com a forma generalizada (invasivo-bolhosa) do PFE ...	34
Figura 8.	Paciente com a forma generalizada (eritrodérmica) do PFE	34
Figura 9.	Algoritmo da metodologia de imunoistoquímica utilizada neste estudo	35
Figura 10.	A. Esquema da localização das imunomarcações nos linfócitos T regulatórios CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ . B. Microfotografia de dupla imunomarcação CD4/Foxp3 na derme de pacientes com PFE.....	43
Figura 11.	Imunoistoquímica com o anticorpo anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3 ⁺ na epiderme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D).....	45
Figura 12.	Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD4/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3 ⁺ e CD4 ⁺ e CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ na epiderme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D).....	45
Figura 13.	Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD25/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3 ⁺ e CD25 ⁺ e CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ na epiderme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D).....	46
Figura 14.	Imunoistoquímica com anticorpo anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3 ⁺ na derme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D).....	46
Figura 15.	Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD4/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3 ⁺ e CD4 ⁺ e CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ na derme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D).....	47

Figura 16. Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD25/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3 ⁺ e CD25 ⁺ e CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ na derme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D).....	47
Figura 17. Esquema da casuística utilizada neste estudo	50
Figura 18. A. Tempo decorrido entre o início da doença e a primeira consulta (meses) no HCFMUSP. B. Uso de corticosteróides antes da primeira consulta no HCFMUSP	53
Figura 19. Tempo de controle da doença (TCD) nos pacientes de PFE incluídos no estudo	53
Figura 20. Contagem de linfócitos imunomarcados na epiderme de controles e pacientes com pênfigo foliáceo endêmico (PFE). ...	56
Figura 21. Contagem de linfócitos imunomarcados na derme de controles e pacientes com pênfigo foliáceo endêmico (PFE). ...	59
Figura 22. Distribuição do infiltrado dérmico de linfócitos CD4 ⁺ e CD25 ⁺ de acordo com a distribuição das lesões no PFE	60
Figura 23. Correlação inversa entre o número de linfócitos que expressam Foxp3 na epiderme de pacientes com PFE e o tempo de controle da doença (TDC).....	61
Figura 24. Correlação inversa entre o número de linfócitos que expressam o marcador CD4 na derme de pacientes com PFE e o tempo de controle da doença (TDC)	61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Constituintes celulares e humorais do SIS (<i>Skin Immune System</i>).....	16
Tabela 2. Quantificação dos linfócitos imunomarcados na epiderme dos pacientes de PFE e controles	56
Tabela 3. Quantificação dos linfócitos imunomarcados na derme dos pacientes de PFE e controles	59

Lista de Quadros

Quadro 1. Dados demográficos, co-morbidades, e quadro clínico dos doentes de pênfigo foliáceo endêmico.....	52
Quadro 2. Caracterização dos linfócitos T no PFE	64
Quadro 3. Expressão linfocitária no infiltrado dérmico de pacientes com PFE no presente estudo	66
Quadro 4. Linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ^{high} nos pênfigos	67
Quadro 5. Expressão linfocitária no infiltrado epidérmico de pacientes com PFE no presente estudo.....	68

Lago F. *Perfil imunoistoquímico de linfócitos T regulatórios no pênfigo foliáceo endêmico através da expressão do marcador Foxp3* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 87p.

Introdução: Os linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs) desempenham um papel fundamental na manutenção da tolerância aos antígenos próprios e no controle da magnitude da resposta imunológica. Alterações quantitativas ou funcionais foram descritas em diversos distúrbios auto-imunes. O pênfigo foliáceo endêmico (PFE) é uma doença bolhosa cutânea de natureza auto-imune, que compartilha características clínicas e imunopatológicas com o pênfigo foliáceo clássico, mas apresenta achados epidemiológicos próprios. Auto-anticorpos circulantes e teciduais da classe IgG dirigidos contra caderinas desmossômicas (desmogleína 1), levam à perda de adesão entre os queratinócitos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar se a perda de tolerância é associada com alterações quantitativas nos linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na pele de pacientes com PFE. **Métodos:** Amostras de pele de 22 pacientes e 10 controles saudáveis foram submetidos à análise imunoistoquímica com anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3. Fotomicrografias foram obtidas de campos consecutivos ao longo de toda epiderme e derme. A seguir, foi realizada quantificação dos linfócitos Foxp3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD4⁺Foxp3⁺ e CD25⁺Foxp3⁺ em cada compartimento, considerando-se a respectiva área de cada campo (µm²). Valores significativamente estatísticos foram considerados como p<0,05. **Resultados:** Encontramos um infiltrado epidérmico aumentado de linfócitos imunomarcados CD25⁺ (p=0,003), Foxp3⁺ (p=0,04) e CD25⁺Foxp3⁺ (p=0,007), em comparação com os controles. O infiltrado dérmico exibiu uma maior expressão de linfócitos CD4⁺ (p<0,001) e CD25⁺ (p=0,008) em amostras de pele de pacientes com PFE, quando comparados aos controles. **Conclusões:** Nossos achados sugerem que a quebra de tolerância imunológica periférica nos pacientes com PFE não se correlaciona com uma diminuição dos linfócitos T reg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na pele afetada. Entretanto, uma maior expressão de linfócitos CD25⁺Foxp3⁺ no infiltrado epidérmico poderia representar outra população de linfócitos com atividade regulatória, a ser definida.

Descritores: 1.Auto-imunidade 2.Pênfigo 3.Foxp3 4.Linfócitos T reguladores 5.Tolerância imunológica

Summary

Lago F. *Immunohistochemical profile of regulatory T cell Foxp3 marker in endemic pemphigus foliaceus* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 87p.

Background: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) play a crucial role in the maintenance of self tolerance and control of the magnitude of the immune response. Their quantitative or functional impairment has been reported in several autoimmune disorders. Endemic pemphigus foliaceus (EPF) is an autoimmune organ-specific blistering skin disorder that shares many clinical and immunopathological features with classic pemphigus foliaceus, but with unique epidemiological features. Circulating and tissue-bound IgG auto-antibodies react against desmosomal cadherins (desmoglein 1), causing loss of adhesion between keratinocytes. **Aims:** The purpose of this study was to evaluate whether the loss of tolerance is associated with impairment of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in the skin of EPF patients. **Methods:** Skin samples from 22 patients and 10 controls were submitted to immunohistochemistry with anti-CD4, CD25 and Foxp3. Photomicrographs were obtained from consecutive fields along epidermis and dermis; quantification of Foxp3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD4⁺Foxp3⁺ and CD25⁺Foxp3⁺ cells were performed in each compartment, taking into account the respective field area (μm^2). Significance was set at $p < 0.05$. **Results:** We found an enhanced epidermal infiltrate of CD25⁺ ($p = 0.003$), Foxp3⁺ ($p = 0.04$) and CD25⁺Foxp3⁺ ($p = 0.007$) immunostained T cells in EPF patients, when compared to controls. Dermal infiltrate exhibited a higher expression of CD4⁺ ($p < 0.001$) and CD25 ($p = 0.008$) T cells in EPF skin samples than in controls. **Conclusions:** Our findings suggest that the break of peripheral immunologic tolerance in EPF patients did not correlate with an impairment of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells present in the affected skin. However, higher expression of CD25⁺Foxp3⁺ cells in the epidermal infiltrate could be a counterpart of a diverse population of T cells, previously described as exerting a regulatory activity, yet to be defined.

Descriptors: 1.Autoimmunity 2.Pemphigus 3.Foxp3 4.T-lymphocytes, regulatory 5.Immune tolerance

1 Introdução

1.1 Organização do Sistema Imunológico Humano: três níveis de defesa do hospedeiro

A complexidade do sistema de defesa pode ser esquematizada em três níveis: 1. barreiras anatômicas e fisiológicas, 2. imunidade inata, 3. imunidade adaptativa. A falência em algum ponto destes pode facilitar o aparecimento de doença infecciosa, inflamatória ou auto-imune ¹.

1.1.1 Barreiras anatômicas e fisiológicas

A pele intacta, os mecanismos mucociliares, o baixo pH estomacal, e as lisozimas bacteriolíticas nas lágrimas e na saliva constituem barreiras anatômicas e fisiológicas que formam a primeira linha de defesa contra patógenos ¹.

1.1.2 Imunidade inata

Os mecanismos da imunidade inata reforçam a proteção oferecida pelo sistema de barreiras ². Formado por células do sistema hematopoiético como macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e

células NK, a imunidade inata também apresenta componente humoral representado por proteínas do complemento, *LPS binding protein*, *mannose binding lectin*, proteína C reativa e peptídeos antimicrobianos.

A imunidade inata conta com um repertório limitado de receptores para identificar patógenos invasores. Apesar de restrito, estes receptores são comuns a um grande número de patógenos, viabilizando o reconhecimento e eliminação de grande parte dos agentes infecciosos *nonself*¹.

Caracterizada pela sua alta velocidade de atuação, a imunidade inata inicia a resposta inflamatória protetora minutos após a exposição ao patógeno, e dá início à ativação da subsequente resposta imunológica adaptativa, que pode levar de quatro a sete dias até que se complete.

Uma vez que o patógeno penetra através das barreiras epiteliais, encontra macrófagos teciduais dotados de receptores de membrana. Havendo reconhecimento, tem início uma resposta inflamatória com consequente acúmulo de proteínas do complemento, citocinas e quimiocinas, que atuam em conjunto recrutando para o local outras células fagocíticas, especialmente neutrófilos. Ainda, as citocinas liberadas pelas células fagocíticas induzem febre, produção de proteína C reativa e mobilização de células apresentadoras de antígeno, necessárias para o início da resposta imune adaptativa. Os patógenos virais são reconhecidos pelas células nas quais replicam-se, levando à produção de interferons que inibem o processo de replicação viral e ativam as células NK, capazes de distinguir entre células infectadas e não infectadas³.

Entretanto, esta resposta inata induzida pode falhar em conter o processo infeccioso. Neste caso, macrófagos e outras células ativadas auxiliam o desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

1.1.3 Imunidade adaptativa

A resposta imune adaptativa apresenta-se como um sistema mais evoluído, em que o reconhecimento de moléculas específicas antigênicas é guiado pela diversidade dos receptores dos linfócitos T e B. Durante o desenvolvimento, grupos de segmentos gênicos são continuamente rearranjados e agrupados de forma a criar um vasto repertório de receptores, possibilitando que componentes de todos os potenciais patógenos sejam reconhecidos. Esses dois principais subgrupos de linfócitos são assim responsáveis pela função efetora da imunidade adaptativa e permitem memória imunológica, mediando em menor intervalo de tempo a resposta imune depois de uma subsequente exposição ao antígeno e regulando a homeostase imunológica do indivíduo ⁴.

Depois de se desenvolverem nos órgãos linfóides primários (timo e medula óssea), os linfócitos T e B migram para os órgãos linfóides secundários, onde se realiza o contato com antígenos captados do sangue e da linfa. A resposta imunológica adaptativa tem início nestas áreas ⁵.

Linfócitos T maduros que não encontraram seu antígeno são denominados linfócitos T *naive*. Para integrarem a resposta imune

adaptativa, um linfócito T *naïve* deve primeiramente encontrar seu antígeno, proliferar-se e diferenciar-se em célula capaz de contribuir para a remoção do antígeno. Uma vez ativados, os linfócitos T *naïve* passam a ser linfócitos T efetores armados, desempenhando seu papel quando reconhecem seu antígeno em outras células.

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno, que ao fagocitarem e apresentarem o antígeno em sua superfície através do complexo MHC, fazem o contato do antígeno capturado nos sítios de infecção com o linfócito T *naïve*. Esta interação ocorre durante a recirculação dos linfócitos T *naïve* através dos órgãos linfóides periféricos. Na região cortical destes, encontram-se células dendríticas maduras que expressam em sua superfície um complexo de MHC ligado a peptídeos antigênicos. Havendo o reconhecimento antígeno-específico por parte dos LT *naïve*, estes são ativados a se proliferarem e a se diferenciarem como linfócitos T efetores armados ⁶⁻⁸.

As células T efetoras apresentam três classes funcionais distintas, conforme o patógeno envolvido. Peptídeos de patógenos intracelulares que multiplicam-se no citoplasma são carregados até a superfície celular por moléculas de MHC classe I e são apresentados a LT CD8⁺. Peptídeos antigênicos de patógenos que se multiplicam em vesículas intracelulares e aqueles derivados de bactérias extracelulares ingeridas e toxinas são carregados até a superfície celular por moléculas de MHC classe II e conduzidos até os LT CD4⁺, que podem se diferenciar em dois tipos de células T efetoras: Th1 e Th2.

A resposta imune mediada por Th1 ativa as propriedades microbidas dos macrófagos contra patógenos intracelulares e induz a produção de IgG com propriedades opsonizantes pelos LB, auxiliando o processo de fagocitose. Os linfócitos Th2 iniciam a resposta imune humoral, ativando os LB a produzirem anticorpos direcionados a patógenos extracelulares ⁹.

A habilidade de se promover um vasto repertório de respostas dotadas de alta especificidade aumenta a chance de ocorrer um ataque inapropriado contra componentes próprios dos tecidos, culminando com o aparecimento de uma doença inflamatória ou auto-imune na pele ou em outros órgãos ⁵. Para prevenir contra estes ataques, a imunidade adaptativa dispõe de um complexo sistema regulatório, discutido a seguir.

1.2 Os linfócitos T regulatórios

Além dos mecanismos delecionais e de inativação funcional implicados na eliminação de linfócitos T e B auto-reativos, é conhecido que os linfócitos T regulatórios desempenham papel central na manutenção da homeostase imunológica em diferentes circunstâncias. Estas células mantêm a tolerância aos constituintes próprios do organismo, controlando a auto-imunidade, previnem resposta exagerada a patógenos e alérgenos, auxiliam na regulação da flora microbiana, ao mesmo tempo que facilitam que os tumores escapem da vigilância imunológica ¹⁰.

Em 1972, estes linfócitos são descritos como linfócitos T supressores por Gershon et al.¹¹. Em 1995, são “redescobertos” por Sakaguchi et al.¹², que revelam uma pequena população de LT CD4⁺ que co-expressam o marcador CD25 e exibem atividade supressora em cobaias adultos¹³.

Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ que apresentam função regulatória em humanos foram subsequentemente identificados por vários grupos¹⁴. O caráter supressivo destas células foi reforçado após as observações de que um membro da família de fatores de transcrição *forkhead*, o *forkhead box p3* – Foxp3, possui expressão seletiva nestes linfócitos T CD4⁺CD25⁺, sendo essencial para seu desenvolvimento¹⁵, e que mutações em sua codificação genética podem levar à função deficiente dos linfócitos T reg, constituindo síndrome fatal recessiva conhecida como IPEX. Os achados da síndrome IPEX são consequentes à perda da atividade funcional das células T reg, com falha na regulação imunológica¹⁶. Acomete crianças do sexo masculino, manifestando-se por quadro de enteropatia, endocrinopatia auto-imune, dermatite e citopenias imuno-mediadas. A desregulação alérgica causada pela síndrome causa ainda alergia alimentar, altos níveis de IgE e eosinofilia¹⁶.

Os linfócitos T reg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ constituem uma população de células que pode ser segmentada em dois distintos subgrupos conforme sua origem e desenvolvimento: linfócitos T reg naturais, de origem tímica, e os linfócitos T reg adaptativos, provenientes da indução de linfócitos T maduros na periferia. Embora muito semelhantes na sua função efetora e fenótipo, as duas subpopulações apresentam algumas diferenças entre si. As células T

regulatórias de ocorrência natural representam o contingente mais expressivo dessas células, constituindo mais de 10% dos linfócitos T CD4⁺ circulantes ¹⁷.

As características genéticas e fenotípicas dos LT reg naturais são expressas durante sua maturação tímica, conferindo a esta linhagem um grande comprometimento com a função de célula regulatória. Já os LT reg adaptativos são LT convencionais induzidos periféricamente a desenvolver fenótipo regulatório na presença de IL-2 e TGF- β ¹⁸ (Figura 1).

Figura 1. Linfócitos T regulatórios naturais e induzidos

LT reg CD4⁺CD25⁺ naturais desenvolvem-se no timo e são exportados para a periferia, onde expressam Foxp3. Linfócitos CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ podem ser induzidos a se diferenciar em LT reg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, na presença de IL-2 e TGF- β . Linfócitos Tr1 secretores de IL-10 são Foxp3⁻ e exercem sua função regulatória através da secreção de citocinas supressoras, como IL-10 e TGF- β . (Adaptado de Chatila TA, 2009)

Os LT reg exibem fenótipo $CD4^+CD25^+$ e uma série de marcadores de ativação: OX40 (CD 134), *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4 ou CD152), *glucocorticoid-induced TNFR-related protein* (GITR) e selectina L (CD62L). Todos esses marcadores não são exclusivos dos LT reg, pois podem também estar presentes em LT ativados e em células apresentadoras de antígenos (APC) ¹³. O principal de todos os marcadores é o Foxp3, considerado o mais exclusivo marcador intracelular dos linfócitos T regulatórios, essencial para o seu desenvolvimento, manutenção e funcionalidade ¹⁸. Entretanto, é importante salientar que linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$ são capazes de expressar o marcador Foxp3 ¹⁹ e que em dado momento, todos os linfócitos $CD25^-Foxp3^-$ podem ser ativados, e exibir a expressão destes marcadores de fenótipo regulatório ¹⁹.

A expressão de Foxp3 é necessária para o exercício da atividade supressora de LT reg nas duas subpopulações, porém se apresenta mais estável nos LT reg naturais. A maior instabilidade leva à perda da expressão de Foxp3 nos linfócitos T reg adaptativos ao longo do tempo, com consequente diminuição da sua atividade supressora ¹⁸. Entretanto, foi demonstrado que o número e função destes LT reg persiste mesmo após a sétima década de vida, sugerindo papel do *pool* de transformação periférica dos linfócitos T de memória $CD4^+CD45RO^+CD25^-Foxp3^-$ na renovação deste contingente, já que a função tímica no homem diminui significativamente após a puberdade ¹³.

Vários fatores extrínsecos têm sido implicados no desenvolvimento e estabilidade dos LT reg naturais ²⁰. A estabilidade dos LT reg é controlada

por um feedback positivo dirigido pelo MiRNA, Runx1 e Foxp3, dirigidos por estímulos externos. TGF- β e IL-2 aumentam a expressão de Foxp3 pela fosforilação do complexo SMAD e STAT5, respectivamente. Ao mesmo tempo IL-6, IL-4 e o receptor de célula T (TCR), através de sinalização via STAT6, GATA3 e mTOR, diminuem a expressão de Foxp3²⁰ (Figura 2).

Foxp3 – estabilidade X instabilidade

Figura 2. Estabilidade *versus* instabilidade da expressão de Foxp3

A estabilidade dos LT reg é controlada por mecanismo de *feedback* positivo, impulsionado pelo miRNA, Runx1 e Foxp3, afetados por diversos estímulos extracelulares. TGF- β e IL-2 aumentam a expressão de Foxp3 através da indução da fosforilação do complexo SMAD e STAT5, enquanto IL-6, IL-4 e sinais do TCR diminuem a expressão do Foxp3 através do STAT6, GATA3 e mTOR, respectivamente. (Adaptado de Zhou X et al., 2009)

Analisando a grande variedade de marcadores celulares e as moléculas de sinalização intracelular, torna-se aparente que os LT reg não se encontram em repouso, mas em constante ativação imunológica. Um desbalanço estes fatores intrínsecos e extrínsecos pode levar à desestabilização, com consequente perda da expressão de Foxp3 e perda da função de LT reg.

Evidências recentes sugerem que o *pool* de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico é heterogêneo, e contém linfócitos CD4⁺CD25^{high}

(representando 2 a 3% dos linfócitos T CD4⁺) que apresentam potente atividade regulatória, em contrapartida com uma grande fração de linfócitos CD4⁺CD25^{med} que não apresentam função regulatória ²¹⁻²².

Houve um grande interesse científico nos linfócitos T reg na última década, e atualmente diversas subpopulações de linfócitos parecem exibir atividade regulatória. Os linfócitos T regulatórios do tipo 1 (Tr1) exibem o fenótipo CD4⁺Foxp3⁻, convertem-se ao fenótipo regulatório na presença de IL-10 e IFN- α e estão envolvidos na regulação da resposta imunológica através da sua habilidade em produzir altos níveis de citocinas imunossupressivas IL-10 e TGF- β . Desta forma, os linfócitos Tr1 regulam a resposta de linfócitos T *naïve* e de memória *in vitro* e *in vivo*, e podem suprimir a atuação da imunidade celular em enfermidades mediadas por Th1 e Th2 (Figura 3) ²³.

Outra classe funcional de LT reg CD4⁺ é descrita como linfócitos Th3, identificada após estudos de tolerância oral. A administração oral do antígeno pode resultar na hiporresponsividade da resposta imunológica modulada por dois mecanismos: 1. através da anergia ou deleção clonal dos linfócitos reativos antígeno-específicos, após o fornecimento de uma alta dose do antígeno apresentada à mucosa intestinal; 2. indução da formação de LT reg após exposição a uma baixa concentração antigênica. A administração oral do antígeno promove a formação de resposta Th2 (IL-4/IL-10) ou Th3 (TGF- β). Isto pode ser explicado pelo fato da mucosa intestinal apresentar níveis basais altos de IL-4, IL-10 e TGF- β , propiciando

um microambiente favorável para a diferenciação em Th2 ou Th3. Os LT Th3 são os únicos subtipos de LT que primariamente secretam TGF- β e exercem atividades supressoras sobre Th1 e outras linhagens celulares ²⁴.

Os linfócitos CD4⁺CD25⁺ representam os membros mais importantes da heterogênea família dos linfócitos T regulatórios, que inclui os linfócitos Th3 e Tr1. Entretanto, a atividade regulatória não é restrita apenas aos LT CD4⁺, estendendo-se a alguns subgrupos de LT CD8⁺, alguns dos quais demonstrados unicamente em modelos experimentais. Mecanismos de ação destas classes de LT reg CD8⁺ são diversos, e uma delas parece reconhecer peptídeos derivados de antígenos de superfície celular associados aos antígenos do MHC classe I ²⁵. LT reg CD8⁺ que reconhecem determinantes nas moléculas de imunoglobulinas também foram detectados e a produção de auto-anticorpos em modelos murinos de auto-imunidade foi suprimida após a secreção de TGF- β por estes LT reg CD8⁺ ²⁶ (Figura 3).

Uma classe distinta de LT reg CD8⁺ faz analogia aos linfócitos Tr1, exercendo seus efeitos supressivos primariamente pela secreção de IL-10. Estes linfócitos demonstrados por Gilliet e Liu (2002) através da estimulação de LT CD8⁺ por células plasmocitóides, resultando em LT CD8⁺ produtores de IL-10, são capazes de inibir a resposta proliferativa de LT *naïve* CD8⁺ frente à estimulação por monócitos e células dendríticas maduras ou imaturas ²⁷. Outra população de LT reg CD8⁺ produtores de IL-10 foi identificada co-expressando grande quantidade de CD122, o receptor de IL-2

β -chain. A porcentagem de linfócitos T CD122⁺CD8⁺ é alta (aproximadamente 50%) em murinos jovens, e modelos murinos CD122-deficientes caracteristicamente apresentam um grande número de linfócitos T anormalmente ativados e desenvolvem fenômenos auto-imunes ²⁵.

Linfócitos T CD8⁺CD25⁺, que expressam grande quantidade de Foxp3, GITR, CTLA-4 e receptor 2 do fator de necrose tumoral (TNFR2) estão presentes no septo fibroso e áreas medulares do timo humano. A exemplo dos LT reg CD4⁺CD25⁺, os timócitos CD8⁺CD25⁺ expressam CTLA-4 e TGF- β quando ativados, e suprimem a atividade proliferativa dos LT CD25⁺ autólogos através de mecanismos contato-dependentes, via interação desses marcadores com os receptores de membrana. Desta forma, Cosmi et al (2003) são os primeiros a demonstrar a existência de LT CD8⁺CD25⁺ com atividade regulatória, que compartilham localização, funções, mecanismos de ação e características fenotípicas com os LT reg CD4⁺CD25⁺ ²⁸.

Ainda, Fischer et al. (2005) caracterizam a existência de uma população de LT reg CD4⁻CD8⁻ *double-negative* (DN) , que representam 0,8% a 1,0% dos linfócitos T CD3⁺ no sangue periférico e 2,5% destas células nos gânglios linfáticos. Os LT reg DN atuam suprimindo a resposta imune mediada pelos LT CD8⁺ de maneira antígeno-específica e dose-dependente (Figura 3) ²⁹.

Entretanto, considerando-se os conhecimentos atuais, não está completamente estabelecida a importância biológica das subpopulações de LT reg CD8⁺ e LT reg DN na manutenção da vigilância imunológica.

Figura 3. Diferentes classes dos linfócitos T regulatórios

*(DN: *Double Negative*). (Adaptado de Shevach EM, 2006)

1.3 SALT

Constituída como o maior órgão do corpo humano, a pele exerce importante função de barreira com o meio externo. Esta resistência contra influências externas é dada pelas propriedades físico-químicas do estrato córneo, a camada mais superficial da pele. Além disto, a pele é responsável pela manutenção da homeostase do meio interno, evitando seu ressecamento. Isto se torna possível graças ao dinamismo da derme e da matriz formada por suas fibras elásticas e colágenas³⁰.

Os radicais livres produzidos pela exposição à luz solar geram uma variedade de mecanismos de defesa, como produção de melanina e ativação de sistemas enzimáticos que podem absorver e eliminar o dano ao DNA induzido pela radiação ultravioleta, eliminando potenciais carcinógenos.

Ainda, merecem destaque as funções fisiológicas como a manutenção da temperatura corporal, produção de mediadores endócrinos, regulação da circulação e também aquelas desempenhadas por terminações nervosas e receptores neurais periféricos situados na pele ³⁰.

Além disto, a pele desempenha uma importante função de defesa, onde é encarregada em distinguir o *self* do *non self*, e atuar no combate aos patógenos invasores. Esta resposta imunológica culmina com a destruição das células infectadas e sofre influência de mecanismos de regulação, minimizando assim a ocorrência de danos às áreas vizinhas.

Atuando nesta primeira linha de defesa do organismo, diversos modelos foram criados tentando dar à pele um local distinto dentro do sistema imunológico, destacando-se o SALT, o SIS e o DMU ³⁰.

Em 1978, Streilein JW ³¹ designa o termo *skin associated lymphoid tissues* (SALT) para englobar os queratinócitos, as células de Langerhans intraepidérmicas como células apresentadoras de antígenos, linfócitos T *skin-seeking*, as células endoteliais da pele que direcionam esses linfócitos para a derme e os linfonodos que fazem a drenagem da pele.

Em 1986, Bos e Kapsenberg ³² propõe o termo *skin immune system* (SIS), demonstrando maior complexidade a este sistema, uma vez que mais da metade das células presentes na pele humana normal apresentam funções imunológicas e, portanto, fazem parte do sistema imune. Os componentes celulares e humorais do SIS encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Constituintes celulares e humorais do SIS (*Skin Immune System*)

Componentes celulares	Componentes humorais
Queratinócitos	Defensinas, catelicidinas
Células dendríticas imaturas	Complemento
Células dendríticas maduras	Imunoglobulinas
Monócitos/macrófagos	Citocinas, Quimiocinas
Granulócitos	Neuropeptídeos
Mastócitos	Eicosanóides e Prostaglandinas
Células endoteliais	Radicais livres
Linfócitos T	Lecitinas ligadas à manose

(Adaptado de Bos JD, 2004)

Em 1989, Sontheimer conceitua o *dermal microvascular unit* (DMU), na qual se concentra uma área de maior reatividade imunológica. Situada em torno das vênulas pós-capilares, concentram-se acúmulos de linfócitos T, monócitos, macrófagos teciduais, mastócitos e células dendríticas³³. A DMU pode ser considerada uma subdivisão do SIS.

1.4 Imunovigilância cutânea

Na sua função de constituir a principal interface com o ambiente externo, a pele é constantemente exposta a eventos traumáticos, muitos dos quais de natureza infecciosa. Além disso, a pele possui uma flora abundante e variada, dependente de um mecanismo de tolerância da

resposta imunológica cutânea. Evidências crescentes apontam que os linfócitos T reg participam da modulação da magnitude da resposta imunológica cutânea, efetuando o controle do estado de ativação dos linfócitos T efetores, não apenas para manter a tolerância periférica aos auto-antígenos, mas também para prevenir resposta inflamatória exagerada a flora residente não patogênica.

A expressão de diferentes moléculas de adesão e receptores de citocinas determinam a migração específica de leucócitos em diferentes tecidos. Em decorrência da crítica interface representada pela barreira cutânea, um sofisticado sistema de imunovigilância desenvolveu-se, com recrutamento para a pele de linfócitos T de memória do sangue periférico que exibem receptores *skin-homming*, definidos pela presença do *Cutaneous Lymphocyte-associated antigen* (CLA) e CCR4. Hirahara K et al (2010) evidenciam que a grande maioria dos LT CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ do sangue periférico expressam os receptores *skin-homming*: 80% dos LT reg apresentam CLA e 96% exibem CCR4³⁴. Além disto, 73% destes linfócitos expressam CCR6, um receptor de citocina que participa da quimiotaxia ao peptídeo humano β defensina, presente em abundância na pele.

A co-expressão de marcadores como CD62L e CCR7 confere a habilidade dos LT reg a migrarem do sangue para os tecidos linfóides secundários, sugerindo um papel dos LT reg em controlar a imunidade sistêmica como linfócitos T de memória centrais, situados nos órgãos linfóides secundários. Nos linfonodos periféricos, cerca de 80% dos LT reg Foxp3⁺

expressam CCR7 em níveis significativos. Uma proporção de 30% dos linfócitos T reg expressam CD103 ($\alpha_E\beta_7$), que interage com a caderina E ligante exibida pelas células epiteliais, e 50% apresentam níveis altos de CD62L, que mostra afinidade pelas adressinas vasculares CD34, GlyCAM-1 e MAdCAM-1, presentes no endotélio dos linfonodos e do tecido linfóide das mucosas ³⁵.

A expressão destes *homming receptors* nos LT reg controlam seu tráfego, localização e promovem a compartimentalização da resposta imune por estes mediada.

1.5 Pênfigos

O termo pênfigo refere-se a um grupo de doenças auto-imunes, que apresentam em comum a perda da adesão celular epidérmica, manifestada clinicamente pela formação de bolhas e erosões na superfície epitelial. Em todas as formas de pênfigo, auto-anticorpos (especialmente da classe IgG) direcionados contra estruturas protéicas epiteliais são detectados no soro e encontrados *in vivo* em padrão característico no epitélio afetado ³⁶.

Os pênfigos são classificados em diferentes variantes clínicas ³⁷:

- pênfigo vulgar (variantes: vegetante, herpetiforme)
- pênfigo foliáceo (eritematoso, clássico, endêmico - fogo selvagem, herpetiforme)

- pênfigo paraneoplásico
- pênfigo por IgA
- pênfigo induzido por drogas

As formas clínicas mais frequentes são: o pênfigo foliáceo (PF) e o pênfigo vulgar (PV). Os auto-anticorpos IgG (especialmente IgG4) dirigidos contra antígenos do desmossomo são patogênicos, uma vez já demonstrada a reprodução clínica, histológica e imunopatológica da enfermidade em modelos experimentais murinos após transferência passiva³⁸.

1.5.1 Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE) ou Fogo Selvagem

O pênfigo foliáceo endêmico ou fogo selvagem apresenta características clínicas semelhantes às do pênfigo foliáceo clássico. É diferenciado por sua epidemiologia peculiar, que inclui áreas endêmicas no Brasil, a ocorrência de casos familiares e acometimento de crianças e adultos jovens. Ainda, trabalhos recentes demonstram a presença de anticorpos IgM e IgE dirigidos contra desmogleína 1 (Dsg1) no soro dos doentes e controles sadios que habitam as áreas endêmicas de PFE³⁹⁻⁴⁰

O PFE apresenta etiopatogenia que sofre influência de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Existe uma frequência aumentada de HLA DR1, DQ1 e DR4 e menor ocorrência de HLA DR3, DQ2 e DR7. Alguns dados sugerem que os haplotipos HLA DR7 e DQW2 podem conferir resistência ao desenvolvimento de pênfigo foliáceo³⁹⁻⁴⁰.

No pênfigo foliáceo, auto-anticorpos contra desmogleína 1 (glicoproteína transmembranosa de 160 kDa) são detectados⁴⁰⁻⁴¹, mas uma pequena porcentagem de pacientes (7%) apresentam anticorpos anti-desmogleína 3⁴². A subclasse IgG4 está relacionada à doença ativa, enquanto nos indivíduos sadios ou em remissão, auto-anticorpos contra a Dsg1 podem ser detectados, mas geralmente pertencem ao isotipo IgG1, e reconhecem epítomos não patogênicos do antígeno⁴³.

Do ponto de vista histopatológico, a bolha formada é intramalphighiana alta, uma vez que há perda de adesão entre membranas justapostas das células epidérmicas adjacentes através das organelas de adesão – os desmossomos⁴⁴⁻⁴⁵. As células assumem um aspecto arredondado, sem nenhum contato célula-célula, conhecido na microscopia eletrônica como acantólise⁴⁶.

Ao contrário do pênfigo vulgar, não há lesões mucosas mesmo quando a imunofluorescência demonstra auto-anticorpos na mucosa oral *in vivo*³⁶. A imunofluorescência direta (IFD) da pele perilesional demonstra depósitos de IgG e/ou C3 intercelulares predominantes na porção superior do estrato de Malpighi⁴⁷.

As lesões cutâneas do pênfigo foliáceo são bolhas pequenas, flácidas, frágeis e produzem erosões rasas. Eritema, descamação, formação de crostas são achados comuns ao redor das bolhas e nas áreas livres de lesões³⁶.

É uma doença crônica e debilitante, mas com melhor prognóstico em relação ao pênfigo vulgar, devido à natureza superficial das lesões e ausência de comprometimento mucoso.

1.5.2 Pênfigo Vulgar (PV)

Pênfigo vulgar é a mais comum forma de pênfigo observada na América do Norte e Europa. As lesões de pênfigo vulgar desenvolvem-se primeiramente na mucosa oral em 60% dos casos e podem progredir para lesões cutâneas, afetando a porção cefálica, cervical, o tronco superior, e as áreas intertriginosas, tais como como axilas e região inguinal. As lesões são restritas ao epitélio escamoso estratificado e raramente há acometimento de órgãos internos. Bolhas pequenas e flácidas rompem-se facilmente, dando lugar a grandes áreas erosadas ³⁶.

Pyotr Vasilyewich Nikolsky foi o primeiro autor a descrever o sinal que ganhou seu nome em 1896. A pressão tangencial exercida na pele lesional, perilesional ou em áreas livres de lesões cutâneas de pacientes com pênfigo resulta em uma extensão da bolha ou perda da epiderme na área imediatamente em torno da lesão. A pele destes pacientes apresenta uma fraca relação e contato entre a camada córnea e a camada granulosa, mesmo nas áreas de pele aparentemente livres de doença. O sinal de Nikolsky, de grande valia na diferenciação das doenças vésico-bolhosas cutâneas, é positivo nos pênfigos, embora também possa estar presente na

necrólise epidérmica tóxica, na síndrome da pele escaldada estafilocócica, no impetigo bolhoso e na epidermólise bolhosa ⁴⁸.

No pênfigo vulgar, a perda de adesão afeta todas as camadas da epiderme, e a bolha se forma imediatamente acima da camada basal. Apesar dessa perda de adesão, as células epiteliais basais permanecem fortemente ligadas à membrana basal da derme. Infiltração das bolhas com células inflamatórias é extremamente variável, e lesões recentes ou na variante herpetiforme podem ser ricas em eosinófilos ⁴⁹⁻⁵⁰. Na IFD, depósitos de IgG e C3 intercelulares na porção média e inferior ou em toda epiderme da pele perilesional ou mucosa são observados.

O auto-antígeno principal do pênfigo vulgar é a desmogleína 3 (Dsg 3), uma glicoproteína de 130 kDa. Os auto-anticorpos IgG patogênicos são dirigidos contra a desmogleína 3 na forma mucosa ou contra desmogleínas 1 e 3 na apresentação cutâneo-mucosa da doença. Pacientes com doença ativa apresentam altos títulos de IgG4 sérica, enquanto a IgG1 se relaciona à remissão ou fase pré-clínica, à semelhança do que ocorre no PFE ^{38, 51-52}.

1.5.3 Imunopatologia dos Pênfigos

O achado típico nos pênfigos é a presença de auto-anticorpos IgG contra a superfície celular dos queratinócitos. Esses autoanticorpos, primeiramente detectados por Beutner e Jordon (1964) ⁵³ por imunofluorescência indireta (IFI), também são identificados depositados na

superfície celular dos queratinócitos da pele perilesional de pacientes com lesões ativas de pênfigo vulgar ou foliáceo, utilizando-se técnica de imunofluorescência direta ⁵⁴. Por IFI, autoanticorpos IgG circulantes são detectados nos doentes em 90-100% em quadros ativos ⁵⁵. Pacientes com doença localizada e aqueles em remissão, apresentam ausência de anticorpos circulantes ou anticorpos em baixos títulos, em geral às custas da IgG1 ⁴⁰.

Existe uma correlação positiva, mas nem sempre presente, entre os títulos de anticorpos anti-Dsg1 circulante e a atividade da doença no pênfigo vulgar e no pênfigo foliáceo. Nos pacientes em remissão a atividade da doença nem sempre se correlaciona com os títulos de auto-anticorpos circulantes ⁵⁶⁻⁵⁷. Isto se deve ao fenômeno de *epitope spreading* intramolecular, onde auto-anticorpos de diferentes isotipos de IgG dirigem-se contra diferentes porções da molécula-alvo ⁵⁸. Uma das possíveis explicações para esse mecanismo seria a migração do alvo dos auto-anticorpos, que pode se estender para outros epítomos na mesma proteína ou em proteínas distintas. Outra situação inclui a exposição de antígenos ocultos, que são revelados em consequência de um processo inflamatório decorrente de auto-imunidade ⁵⁸.

No PFE, auto-anticorpos não patogênicos contra a porção extracelular 5 (EC-5) da Dsg1 podem ocorrer em indivíduos saudáveis que habitam as áreas endêmicas. Caso esses indivíduos possuam predisposição genética, ou sofram a influência de algum estímulo ambiental, tal como exposição repetida à picadura de insetos hematófagos, auto-anticorpos patogênicos

passam a reconhecer outros determinantes antigênicos da Dsg1 (EC1 e EC2), caracterizando o fenômeno de *epitope spreading* e deflagrando a enfermidade cutânea. Um possível mecanismo de mimetismo antigênico parece estar implicado no desencadeamento da resposta auto-imune ⁴⁰.

A técnica de detecção de auto-anticorpos anti-Dsg 1 e 3 por ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) tem demonstrado maior sensibilidade e especificidade que a imunofluorescência indireta nos pênfegos ⁵⁹⁻⁶¹.

1.5.4 O papel dos linfócitos T regulatórios nos pênfegos

Evidências crescentes da deficiência de células T regulatórias na quebra da tolerância e produção de auto-anticorpos no PV têm sido relatadas por diversos autores ⁶²⁻⁶⁴.

Sugiyama H. et al ⁶³, em estudo publicado em 2006, evidencia que a proporção de linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25^{high} em relação à população de linfócitos CD4⁺ encontra-se reduzida em até dez vezes no sangue de pacientes com pênfigo vulgar, quando comparado aos controles. Nestes linfócitos T regulatórios, também houve diminuição da expressão de Foxp3.

A participação das células Tr1 na patogênese do pênfigo vulgar foi alvo de estudo conduzido por Veldman C. et al ⁶⁴. Este grupo demonstra que as células Tr1-desmogleína 3 específicas são encontradas em maior número no sangue de indivíduos saudáveis que em pacientes com PV, sugerindo a participação dessas células regulatórias adaptativas, pelo menos em parte,

no *pool* de células envolvidas no mecanismo de tolerância imunológica contra a desmogleína 3 (Figura 4).

Figura 4. Envolvimento dos linfócitos T na patogênese do PV

A produção pelos linfócitos B auto-reativos é regulada pelos linfócitos Th1 e Th2 Dsg3 - e Dsg1- específicos. Linfócitos Th Dsg3-reativos também são encontrados em portadores saudáveis HLA classe II, PV-relacionados. LT regs podem ser essenciais na manutenção da tolerância periférica dos linfócitos B a Dsg3, uma vez que linfócitos Tr1 Dsg3 reativos são mais frequentemente encontrados em indivíduos saudáveis do que em pacientes com PV. (*APC= *antigen presenting cell*). (Adaptado de Veldman C et al, 2004)

Desta forma, parece existir no PV um desbalanço entre as células T regulatórias e as células Th auto-agressivas desmogleína 3 específicas no PV, com alta proporção da relação $IL10^{+}Th2/Tr1$ vista nos doentes com pênfigo⁶⁵.

O envolvimento das células T regulatórias no PFE ainda não foi estudado, acreditando-se que haja correlação com os achados para o PV, já

que as duas são enfermidades desmogleína-específicas mediadas pela produção de anticorpos auto-agressivos.

Apesar de relativamente bem caracterizadas no sangue de indivíduos saudáveis e com PV, pouco se conhece sobre o número e a função das células T reg na pele, o órgão acometido pela doença.

A identificação das células T regulatórias de ocorrência natural no sangue utiliza-se da quantificação da co-expressão de $CD4^+CD25^{high}$, enquanto que no tecido é necessária a combinação de diversos marcadores. As células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ também expressam CTLA-4, GITR e Foxp3. Tanto o marcador CD25, como o GITR, também podem ser expressos por células T recém-ativadas⁶⁶. Atualmente, a combinação $CD4^+Foxp3^+$ é a melhor maneira de caracterizar células T reg nos tecidos⁶⁷, ainda que existam relatos ocasionais da expressão de Foxp3 em células T não regulatórias $CD4^+$ ou $CD8^+$ ⁶⁸⁻⁶⁹.

2 Justificativa e Objetivos

2.1 Justificativa

Considerando-se que o pênfigo foliáceo endêmico representa um modelo de auto-imunidade cutânea, é possível que ocorram alterações locais no balanço entre linfócitos T efetores e linfócitos T regulatórios, com consequente falha na vigilância imunológica tecidual e a ocorrência de linfócitos T auto-reativos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos Gerais

Tendo em vista o acima exposto e a necessidade do melhor entendimento da participação da imunidade celular tecidual regulatória nos pênfigos, este estudo se propõe a:

1. Avaliar as alterações quantitativas de linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na pele de pacientes com PFE.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Quantificar o número de linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na pele de pacientes com PFE, em comparação com grupo controle (indivíduos sadios).
2. Correlacionar a expressão dos linfócitos T regulatórios encontrados na pele dos pacientes de PFE com a evolução clínica, e possível influência no prognóstico da doença.

3 Métodos

3.1 Casuística

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

Foram incluídos 22 pacientes de pênfigo foliáceo endêmico, de acordo com achados clínicos e imunohistopatológicos, acompanhados no Ambulatório de Doenças Vésico-Bolhosas Auto-Imunes do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, acompanhados no período compreendido entre 1995 a 2008. Como grupo controle, foram selecionados 10 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade.

Todos os indivíduos incluídos apresentavam dados clínicos e histopatológicos compatíveis com pênfigo foliáceo, e eram procedentes ou naturais de áreas endêmicas de PFE (Figura 5). No Brasil, entende-se por área endêmica de PFE as regiões situadas entre 45° e 60° de longitude oeste e entre 5° e 25° de latitude sul com altitudes entre 500 e 800 metros, sendo rara sua ocorrência abaixo de 400 metros, correspondendo sua maior incidência com a área territorial do Distrito Federal e dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins, Minas Gerais, Paraná e São Paulo⁷⁰.

Figura 5. Focos endêmicos do PFE no território brasileiro

Durante a avaliação de fatores prognósticos, foi adotado o critério Tempo de controle da doença (TCD), proposto pelo *Consensus statement on definitions of disease, end points and therapeutic response for pemphigus*⁷¹, definido como o intervalo de tempo decorrido entre o início da terapêutica por um médico e o controle da atividade da doença, onde cessam a formação de novas lesões e as lesões já estabelecidas começam a cicatrizar. O mesmo consenso propõe como remissão completa (sem terapêutica) a ausência de lesões novas ou estabelecidas enquanto o paciente não está recebendo terapêutica sistêmica, por no mínimo dois meses. O termo remissão parcial (com terapêutica mínima) é utilizado na presença de lesões transitórias que cicatrizam dentro de uma semana, enquanto o paciente está recebendo terapêutica mínima (prednisona $\leq 10\text{mg/dia}$). A presença de recidiva (*flare*) é considerada após o surgimento

de três ou mais novas lesões no intervalo de um mês, que não cicatrizam dentro de uma semana, em paciente que havia alcançado o controle da doença.

Os pacientes selecionados estiveram de acordo com a inclusão, após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Destes pacientes, foi realizada análise retrospectiva do prontuário médico para obtenção dos dados epidemiológicos e evolutivos da doença e seleção dos blocos de parafina da biópsia de pele diagnóstica realizada na apresentação inicial da doença.

Todos os doentes (n=22), no momento da realização da biópsia cutânea, apresentavam atividade clínica da doença (sinal de Nikolsky positivo e/ou presença de vesículas ou bolhas superficiais na pele). Foram incluídos dois pacientes com a forma localizada, 14 com a forma invasivo-bolhosa e dois pacientes com eritrodermia (Figuras 6-8).

Figura 6. Pacientes com a forma localizada do PFE

Figura 7. Paciente com a forma generalizada (invasivo-bolhosa) do PFE

Figura 8. Paciente com a forma generalizada (eritrodérmica) do PFE

Para os controles foram selecionados indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade, atendidos no Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, para realização de mamoplastia redutora ou abdominoplastia. Destes indivíduos, após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram captadas as amostras de pele excedentes das plásticas reparadoras, para inclusão como controles no estudo. Os indivíduos controles não se encontravam em tratamento para nenhuma enfermidade associada, e não estavam em uso de imunossupressores sistêmicos.

Os blocos parafinados com amostras de pele dos pacientes de PFE e controles saudáveis foram submetidos a cortes seriados para realização de estudo imunohistoquímico segundo três protocolos (Figura 9):

- 1- imunomarcção para linfócitos Foxp3⁺,
- 2- dupla imunomarcção para linfócitos CD4⁺ e Foxp3⁺,
- 3- dupla imunomarcção para linfócitos CD25⁺ e Foxp3⁺.

Figura 9. Algoritmo da metodologia de imunohistoquímica utilizada neste estudo

As etapas na realização das técnicas de imunomarcção realizadas neste estudo serão descritas a seguir.

3.1.1 Imunomarcacão com anti-Foxp3

- 1- 1ª desparafinização (quente): em xilol, 30 minutos a 60° C.
- 2- 2ª desparafinização (frio): em xilol, 20 minutos a temperatura ambiente.
- 3- Hidratação dos cortes em:
 - álcool absoluto (3X)
 - álcool 95%
 - álcool 80%
 - lavagens em água corrente e destilada.
- 4- Exposição antigênica *steamer* com tampão Tris 10 mmol + 1 mmol EDTA (pH 8,0):
 - lâminas em uma cuba com o tampão (previamente aquecido por 30 minutos), agindo por 15 minutos. Deixar esfriar no próprio tampão antes de prosseguir as lavagens com água corrente, destilada.
- 5- Bloqueio da peroxidase endógena:
 - gua oxigenada a 3% (10 volumes) em 2 banhos de 10 minutos;
 - lavagens em água corrente , destilada.
- 6- Bloqueio com leite mlico 6% diluído em PBS;
 - lavagem por 5 minutos em tampão TBST.
- 7- Incubação com anticorpo primário anti-Foxp3, diluído 1:100 em tampão TBST overnight a 4° C;
 - lavagens (3X) em tampão TBST.
- 8- Incubação com anticorpo secundário anti- rato biotinilado diluído 1:300 em tampão TBST por 30 minutos (temperatura ambiente);
 - lavagens (3X) em tampão TBST.

- 9- Incubação com Streptavidina peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente;
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 10- Revelação com substrato cromogênico diaminobenzidina;
lavagens com água corrente e destilada.
- 11- Contra-coloração em Hematoxilina de Carrazi.
lavar em água corrente e destilada.
- 12- Desidratação dos cortes em :
álcool 50%/ álcool 80%/ álcool 95%/ álcool absoluto (3X)/ xilol (3X);
montagem com *Entellan* ou *Permount*.

Anticorpos:

- *Affinity Purified anti-human Foxp3 clone PCH101, eBioscience catalog number 14-4776*
- *Polyclonal rabbit anti-rat Immunoglobulins –Biotinylated, DakoCytomation code E0468*
- *Streptavidin-HRP (kit LSAB+ System-HRP), DakoCytomation code K0679/ code K0690*

3.1.2 Dupla imunomarcação com anti-CD4/anti-Foxp3

- 1- 1ª desparafinização (quente): em xilol, 30 minutos a 60° C.
- 2- 2ª desparafinização (frio): em xilol, 20 minutos a temperatura ambiente.
- 3- Hidratação dos cortes em :
 - álcool absoluto (3X);
 - álcool 95% ;
 - álcool 80%;
 - lavagens em água corrente e destilada.
- 4- Exposição antigênica *steamer* com tampão Tris 10 mmol + 1 mmol EDTA (pH 8,0):
 - colocação das lâminas em uma cuba com o tampão (previamente aquecido por 30 minutos) por 15 minutos . Resfriamento no próprio tampão e lavagens com água corrente, destilada;
- 5- Bloqueio da peroxidase endógena:
 - água oxigenada a 3% (10 volumes) em 2 banhos de 10 minutos;
 - lavagens em água corrente, destilada e tampão PBS.
- 6- Bloqueio leite molico 6% diluído em PBS;
 - Lavagem por 5 minutos em tampão TBST.
- 7- Incubação com anticorpo primário anti-Foxp3 diluído 1:100 em tampão TBST overnight a 4° C ;
 - lavagens (3X) em tampão TBST.
- 8- Incubação com anticorpo secundário anti- rato biotilado diluído 1:300 em tampão TBST por 30 minutos (temperatura ambiente);
 - lavagens (3X) em tampão TBST.

- 9- Incubação com Streptavidina peroxidase por 30 minutos (temperatura ambiente);
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 10- Revelação com substrato cromogênico;
lavagens com água corrente, destilada e tampão TBST.
- 11- Bloqueio com Dual Enzyme block por 15 minutos a temperatura ambiente;
lavagem por 5 minutos com TBST.
- 12- Incubação com OPD-4 diluído 1:600 em TBST por 1 hora a 37°C;
lavagens (3X) em tampão TBST
- 13- Incubação com Link (Envision G2) por 30 minutos (temperatura ambiente);
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 14- Incubação com Polymer (Envision G2) por 30 minutos (temperatura ambiente);
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 15- Revelação com *Permanent red* observando ao microscópio;
lavagem em água destilada.

Anticorpos:

- *Affinity Purified anti-human Foxp3 clone PCH101, eBioscience catalog number 14-4776*
- *Polyclonal rabbit anti-rat Immunoglobulins –Biotinylated, DakoCytomation code E0468*
- *Streptavidin-HRP (kit LSAB+ System-HRP), DakoCytomation code K0679/ code K0690*
- *Monoclonal mouse anti-human CD45RO, clone OPD4, DAKO code M 0834*
- *Envision G2/AP System rabbit/mouse (permanent red), Dako code K5355*

3.1.3 Dupla imunomarcação com anti-CD25/anti-Foxp3

- 1- 1ª desparafinização (quente): em xilol, 30 minutos a 60° C.
- 2- 2ª desparafinização (frio) :em xilol, 20 minutos (temperatura ambiente).
- 3- Hidratação dos cortes em :
 - álcool absoluto (3X)
 - álcool 95%
 - álcool 80%
 - lavagens em água corrente e destilada.
- 4- Exposição antigênica steamer com tampão Tris 10 mmol + 1 mmol EDTA (pH 8,0):
 - colocar as lâminas em uma cuba com o tampão (previamente aquecido por 30 minutos) e deixar por 15 minutos . Deixar esfriar no próprio tampão antes de prosseguir as lavagens com água corrente, destilada.
- 5- Bloqueio da peroxidase endógena:
 - água oxigenada a 3% (10 volumes) em 2 banhos de 10 minutos;
 - lavagens em água corrente , destilada e tampão PBS.
- 6- Bloqueio leite molico 6% diluído em PBS;
 - lavagem por 5 minutos em tampão TBST.
- 7- Incubação com anticorpo primário anti-Foxp3 diluído 1:100 em tampão TBST overnight a 4° C ;
 - lavagens (3X) em tampão TBST.
- 8 – Incubação com anticorpo secundário anti-rato biotinilado diluído 1:300 em tampão TBST por 30 minutos a temperatura ambiente;
 - lavagens (3X) em tampão TBST.

- 9- Incubação com Streptavidina peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente;
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 10- Revelação com substrato cromogênico;
lavagens com água corrente, destilada e tampão TBST.
- 11- Bloqueio com *Dual Enzyme block* por 15 minutos a temperatura ambiente;
lavagem por 5 minutos com TBST.
- 12- Incubação com CD25 diluído 1:50 em TBST por 2 horas a 37°C;
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 13- Incubação com Link (Envision G2) por 30 minutos (temperatura ambiente);
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 14- Incubação com Polymer (Envision G2) por 30 minutos (temperatura ambiente);
lavagens (3X) em tampão TBST.
- 15- Revelação com *Permanent red* observando ao microscópio;
lavagem em água destilada.

Anticorpos:

- *Affinity Purified anti-human Foxp3 clone PCH101, eBioscience catalog number 14-4776*
- *Polyclonal rabbit anti-rat Immunoglobulins –Biotinylated, DakoCytomation code E0468*
- *Streptavidin-HRP (kit LSAB+ System-HRP), DakoCytomation code K0679/ code K0690*
- *CD-25 mouse monoclonal clone 4C9, Cell Marque*
- *Envision G2/AP System rabbit/mouse (permanent red), Dako code K5355*

3.2 Contagem dos linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Imagens digitais foram obtidas utilizando-se uma câmera digital AxioCam MRc Zeiss (Zeiss, Germany) conectada a um microscópio óptico Axiophot Zeiss (Zeiss, Germany) e a um software de análise de imagens AxioVision 4.8 (Zeiss, Germany). O material ao longo de toda a amostra de pele presente na lâmina foi alvo do estudo, através de microfotografias de 1384x1036 pixels que foram obtidas de, no mínimo, 16 campos consecutivos não-coincidentes ao longo da epiderme e derme de cada lâmina, com aumento de x400. Campos microscópicos que apresentavam áreas com falhas ou tecido não preservado foram excluídos.

Inicialmente foi realizada a documentação das imagens de todas as lâminas com linfócitos imunomarcados em marrom pelo anticorpo anti-Foxp3. Posteriormente realizamos essa documentação fotográfica de duas novas séries: lâminas com dupla-marcação anti-CD4/anti-Foxp3 e lâminas com dupla-marcação anti-CD25/anti-Foxp3, ambas evidenciando uma combinação de cores vermelho e marrom para os linfócitos duplamente marcados. Nas lâminas com dupla marcação anti-CD4/anti-Foxp3 e anti-CD25/anti-Foxp3 foram realizadas também as contagens isoladas dos linfócitos unicamente CD4⁺ ou CD25⁺ (Figura 10).

Figura 10. A. Esquema da localização das imunomarcações nos linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. **B.** Microfotografia de dupla imunomarcacão CD4/Foxp3 na derme de pacientes com PFE

Os linfócitos Foxp3⁺ exibem cor marrom-escuro (assinalados em vermelho), os linfócitos CD4⁺ exibem cor vermelha (assinalados em verde) e os linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ evidenciam uma combinaçao de cores vermelho-marrom (assinalados em azul)

A quantificação de linfócitos Foxp3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD4⁺Foxp3⁺ e CD25⁺Foxp3⁺ foi desenvolvida a partir de microfotografias de 8 a 12 campos de grande aumento de cada compartimento (epiderme e derme) separadamente. Em cada corte foi quantificado o número de células por área, perfazendo um total de pelo menos oito áreas de cada lâmina em cada compartimento (epiderme e derme) e permitindo o cálculo da média do número de linfócitos por unidade de área (número de linfócitos / μm^2) em cada amostra (Figuras 11-16).

A documentação e análise das imagens foram realizadas pelo mesmo médico pesquisador. Em uma primeira etapa, a área da epiderme de cada campo foi delineada definindo uma área de interesse (μm^2). Também foi definida a espessura média (μm) da epiderme, através da medida da espessura em oito diferentes pontos de cada campo. Os linfócitos imunomarcados, de acordo com a positividade da marcação exibida, foram manualmente contados e os resultados foram considerados em relação ao total da área em cada campo (número de linfócitos em cada campo / total da área em cada campo (μm^2) = linfócitos/ unidade de área) (Figuras 11-13). Procedimento similar de contagem foi adotado para a quantificação dos linfócitos positivos na derme e corrigidos pela área total mensurada de cada campo (Figuras 14-16).

O processo de quantificação foi realizado manualmente pelo mesmo examinador, com o auxílio do programa de análise de imagens AxioVision 4.8 (Zeiss, Germany).

Figura 11. Imunoistoquímica com o anticorpo anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3⁺ (seta) na epiderme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D). (x400)

Figura 12. Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD4/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3⁺ (seta) e CD4⁺ (asterisco) e CD4⁺Foxp3⁺ (círculo) na epiderme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D). (X400)

Figura 13. Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD25/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3⁺ (seta) e CD25⁺ (asterisco) e CD25⁺Foxp3⁺ (círculo) na epiderme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D). (X400)

Figura 14. Imunoistoquímica com anticorpo anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3⁺ (seta) na derme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D). (x400)

Figura 15. Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD4/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3⁺ (seta) e CD4⁺ (asterisco) e CD4⁺Foxp3⁺ (círculo) na derme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D). (X400)

Figura 16. Imunoistoquímica com anticorpo anti-CD25/anti-Foxp3, evidenciando linfócitos Foxp3⁺ (seta) e CD25⁺ (asterisco) e CD25⁺Foxp3⁺ (círculo) na derme de pacientes com PFE (A,B) e controles (C,D). (X400)

3.3 Estatística

Os dados descritivos foram analisados de acordo com a média e o desvio-padrão ou coeficiente de variação para as variáveis numéricas, e proporcional (%) para as variáveis categóricas. Para a análise do número de células por área, inicialmente foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmação da distribuição normal dos dados, seguidos do teste T de student nas comparações entre dois grupos, e do teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste pos-roc de Tukey nos casos em que três ou mais grupos foram comparados. Correlações entre dados clínicos e densidades celulares foram desenvolvidas utilizando o teste de Pearson. A análise estatística foi desenvolvida utilizando SPSS, versão 15.0 (SPSS inc®, Alabama – USA). Níveis com significância estatística foram fixados em 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Dados Clínicos e Demográficos

Foi realizada a análise de 22 pacientes com PFE, classificados de acordo com critérios clínicos em forma localizada (L) e forma generalizada (G) da doença, sendo a última subdividida nos subgrupos invasivo-bolhoso (IB) e eritodérmico (E). Dois pacientes apresentavam a doença localizada e 20 pacientes a doença generalizada, sendo 14 destes a forma invasivo-bolhosa e os outros seis a forma eritodérmica (Figura 17).

Figura 17. Esquema da casuística utilizada neste estudo

Em relação à distribuição de acordo com o gênero, 10 (45,5%) dos pacientes com PFE estudados eram do sexo masculino e 12 (54,5%) do sexo feminino. Estes pacientes, apresentavam idades que variaram de 16 a 67 anos, com média de 39,5 anos (Quadro 1). Nos controles, a ocorrência de indivíduos homens foi de 40% (4/10) e de mulheres de 60% (6/10), com faixa etária oscilando de 24 a 60 anos e média de 42 anos.

O tempo decorrido entre o início da apresentação da doença e a primeira biópsia de pele, realizada quando da admissão no ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, foi de 10,6 meses, provavelmente devido à dificuldade de admissão destes pacientes em um hospital de atenção terciária. Cinco dos 22 pacientes fizeram uso de corticosteróides sistêmicos (prednisona) antes da realização da biópsia cutânea. Treze dos 22 pacientes apresentavam co-morbidades, sendo que hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi a mais frequente, e encontrada em 38,4% (5/13) dos sujeitos incluídos no estudo (Quadro 1) (Figura 18).

Os resultados obtidos demonstraram que em 14 dos 22 pacientes, o tempo de controle da doença (TCD) (71) foi alcançado em menos de seis meses, sendo que em oito, este controle ocorreu após o primeiro mês de tratamento imunossupressor. Nos pacientes restantes (8/22), o TCD foi superior a seis meses (Quadro 1) (Figura 19).

Quadro 1. Dados demográficos, co-morbidades, e quadro clínico dos doentes de pênfigo foliáceo endêmico

Gênero (masculino/feminino)	(10/12)
Idade (anos)	(16-67, 39,5 média de idade)
Tempo decorrido entre o início da apresentação da doença e a realização da biópsia de pele (meses)	(1-72, 10,6 tempo médio)
Uso de corticosteróides antes da realização da biópsia de pele (n/total)	5/22
Condições preexistentes Hipertensão arterial sistêmica Hipercolesterolemia Asma/Bronquite <i>Diabetes mellitus</i> Doença cardiovascular crônica Artrite Câncer Ausência de comorbidades	n 5 1 3 1 1 1 1 9
Apresentação clínica da doença (n)	Localizado(2), Generalizado(20): (Invasivo-Bolhoso(14) / Eritrodérmico(6))
Locais da biópsia de pele (n)	Face (2) Tórax (3) Abdômen (2) Braços/Pernas (3/1) Dorso (11)
Tempo de controle da doença (n)	1 mês (8) 2-6 meses (6) >6 meses (8)
Desfecho clínico após seguimento Remissão completa sem terapêutica Remissão parcial com terapêutica mínima Doença ativa (recidiva)	(n=22) 6 13 3

Figura 18. A. Tempo decorrido entre o início da doença e a primeira consulta (meses) no HCFMUSP. **B.** Uso de corticosteróides antes da primeira consulta no HCFMUSP

Figura 19. Tempo de controle da doença (TCD) nos pacientes de PFE incluídos no estudo

Todos os desfechos clínicos foram considerados baseando-se na situação clínica dos pacientes durante a última revisão dos prontuários médicos em dezembro de 2008.

4.2 Linfócitos imunomarcados na epiderme

4.2.1 Epiderme – Linfócitos Foxp3⁺

Foi observado um aumento com significância estatística na imunomarcagem para linfócitos Foxp3⁺ na epiderme de pacientes com PFE em relação aos controles.

(CTRL=0,06x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 0,1x10⁻⁵, **PFE=1,0x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 2,1x10⁻⁵**, p=0,04) (Tabela 2-Figura 20).

4.2.2 Epiderme – Linfócitos CD25⁺

Foi observado um aumento com significância estatística na imunomarcagem para linfócitos CD25⁺ na epiderme de pacientes com PFE em relação aos controles.

(CTRL=0,09x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 0,3x10⁻⁵, **PFE=1,9x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 2,5x10⁻⁵**, p=0,003) (Tabela 2-Figura 20).

4.2.3 Epiderme – Linfócitos CD4⁺

Não foram encontradas diferenças com significância estatística na expressão de linfócitos CD4⁺ na epiderme de pacientes com PFE e controles.

(CTRL= $0,1 \times 10^{-5}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$, PFE= $0,4 \times 10^{-5}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 1,3 \times 10^{-5}$, $p=0,443$) (Tabela 2-Figura 20).

4.2.4 Epiderme – Dupla marcação

Foi observado um aumento com significância estatística na dupla imunomarcacão para linfócitos CD25⁺Foxp3⁺ na epiderme de pacientes com PFE em relação aos controles. (CTRL=0, **PFE= $0,7 \times 10^{-5}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 1,1 \times 10^{-5}$** , $p=0,007$) (Tabela 2-Figura 20).

Não foram encontradas diferenças com significância estatística na expressão de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ duplamente marcados na epiderme entre pacientes com PFE e controles. (CTRL=0, PFE= $0,2 \times 10^{-5}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 1,2 \times 10^{-5}$, $p=0,466$) (Tabela 2-Figura 20).

Tabela 2. Quantificação dos linfócitos imunomarcados na EPIDERME dos pacientes de PFE e controles

Linfócito	Controle	PFE	Significância
Foxp3 ⁺	0,06x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±0,1x10 ⁻⁵)	1,0x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±2,1x10 ⁻⁵)	p=0,04
CD25 ⁺	0,09x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±0,3x10 ⁻⁵)	1,9x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±2,5x10 ⁻⁵)	p=0,003
CD4 ⁺	0,1x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±0,4x10 ⁻⁵)	0,4x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±1,3x10 ⁻⁵)	p=0,443
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	0 linfócitos/um ² (±0)	0,7x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±1,1x10 ⁻⁵)	p=0,007
CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	0 linfócitos/um ² (±0)	0,2x10 ⁻⁵ linfócitos/um ² (±1,2x10 ⁻⁵)	p=0,466

*p<0,05

Figura 20. Contagem de linfócitos imunomarcados na epiderme de controles e pacientes com pênfigo foliáceo endêmico (PFE). *p<0,05

4.3 Linfócitos imunomarcados na derme

4.3.1 Derme – Linfócitos Foxp3⁺

Não foram encontradas diferenças com significância estatística na expressão de linfócitos Foxp3⁺ na derme entre pacientes com PFE e controles.

(CTRL=2,1x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 1,4x10⁻⁵, PFE=3,2x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 4,3x10⁻⁵, p=0,477) (Tabela 3-Figura 21).

4.3.2 Derme – Linfócitos CD25⁺

Foi encontrado um aumento com significância estatística na imunomarcagem para linfócitos CD25⁺ na derme de pacientes com PFE em relação aos controles.

(CTRL=1,3x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 1,0x10⁻⁵, **PFE=5,9x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 7,2x10⁻⁵**, p=0,008) (Tabela 3-Figura 21).

4.3.3 Derme – Linfócitos CD4⁺

Foi encontrado um aumento com significância estatística na imunomarcagem para linfócitos CD4⁺ na derme de pacientes com PFE em relação aos controles.

(CTRL=3,6x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 1,4x10⁻⁵, **PFE=16,9x10⁻⁵ linfócitos/um² ± 14,0x10⁻⁵**, p< 0,001) (Tabela 3-Figura 21).

4.3.4 Derme – Dupla marcação

Não foram encontradas diferenças com significância estatística na expressão de linfócitos CD25⁺Foxp3⁺ duplamente marcados na epiderme entre pacientes com PFE e controles.

(CTRL= $1,3 \times 10^{-5}$ linfócitos/um² $\pm$ $0,7 \times 10^{-5}$, PFE= $2,0 \times 10^{-5}$ linfócitos/um² $\pm$ $3,0 \times 10^{-5}$, p=0,452) (Tabela 3-Figura 21).

Da mesma forma, também não foram encontradas diferenças com significância estatística na expressão de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ duplamente marcados na derme entre pacientes com PFE e controles.

(CTRL= $0,8 \times 10^{-5}$ linfócitos/um² $\pm$ $2,1 \times 10^{-5}$, PFE= $2,1 \times 10^{-5}$ linfócitos/um² $\pm$ $4,2 \times 10^{-5}$, p=0,32) (Tabela 3-Figura 21).

Tabela 3. Quantificação dos linfócitos imunomarcados na DERME dos pacientes de PFE e controles

Linfócito	Controle	PFE	Significância
Foxp3 ⁺	2,1x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±1,4x10 ⁻⁵)	3,2x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±4,3x10 ⁻⁵)	p=0,477
CD25 ⁺	1,3x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±1,0x10 ⁻⁵)	5,9x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±7,2x10 ⁻⁵)	p=0,008
CD4 ⁺	3,6x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±1,4x10 ⁻⁵)	16,9x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±14,0x10 ⁻⁵)	p<0,001
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	1,3x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±0,7x10 ⁻⁵)	2,0x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±3,0x10 ⁻⁵)	p=0,452
CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	0,8x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±2,1x10 ⁻⁵)	2,1x10 ⁻⁵ linfócitos/μm ² (±4,2x10 ⁻⁵)	p=0,320

*p<0,05

Figura 21. Contagem de linfócitos imunomarcados na derme de controles e pacientes com pênfigo foliáceo endêmico (PFE). *p<0,05

4.4 Expressão linfocitária , distribuição e controle da doença

De acordo com a distribuição clínica das lesões de PFE (localizado x generalizado), foi encontrada uma expressão aumentada de linfócitos CD4+ (localizado $4,76 \times 10^{-4}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 2,0 \times 10^{-4}$, generalizado $1,3 \times 10^{-4}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 0,9 \times 10^{-4}$, $p < 0,001$), assim como de linfócitos CD25+ (localizado $2,0 \times 10^{-4}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 1,2 \times 10^{-4}$, generalizado $0,4 \times 10^{-4}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 0,6 \times 10^{-4}$, $p = 0,004$) na derme de pacientes com PFE (Figura 22).

Figura 22. Distribuição do infiltrado dérmico de linfócitos CD4+ e CD25+ de acordo com a distribuição das lesões no PFE

Para o tempo de controle da doença e expressão dos linfócitos imunomarcados, nas biópsias de pele de pacientes com PFE foi observada uma correlação inversa com a expressão de linfócitos Foxp3+ na epiderme ($r = -0,463$, $p = 0,03$) e uma correlação inversa com o número de linfócitos CD4+ na derme ($r = -0,449$, $p = 0,036$) (Figuras 23 e 24).

O pênfigo foliáceo endêmico é uma condição resultante de uma agressão auto-imune na pele, onde a formação de bolhas resulta de autoanticorpos da classe IgG direcionados contra a Dsg 1. O papel da resposta imune anormal levando à clivagem subepidérmica é indiscutível, conforme comprovado em modelos murinos ⁷². O PFE é também um modelo de *epitope spreading* intramolecular, sofrendo a influência de fatores genéticos e ambientais para o desencadeamento da doença cutânea ⁵⁸.

A auto-imunidade é consequência da quebra de tolerância : nos pênfigos vulgar e foliáceo, linfócitos T CD4⁺ auto-reativos pode desempenhar papel crucial no desencadeamento da resposta auto-imune ^{54,62}. No PFE, existem dois estudos iniciais sugerindo a interferência dos linfócitos T neste processo ^{50,54}.

A primeira evidência da participação dos linfócitos T no PFE foi demonstrada por Santi e Sotto ⁵⁰, ao caracterizarem a resposta imune utilizando técnicas imunohistoquímicas, e concluírem que a população linfocitária predominante na pele de pacientes com PFE era de linfócitos T CD4⁺. Este estudo também apontou uma diminuição do número de células de Langerhans e ausência de expressão de ICAM-1 na pele lesional (Quadro 2).

Um segundo estudo realizado no sangue periférico de doentes de PFE, por Lin et al ⁵⁴ demonstrou que linfócitos T reativos no PFE, os quais

expressam um fenótipo de linfócito T CD4⁺ de memória, produzem um padrão de secreção de citocinas do tipo T *helper-like* (Th2), e são restritos ao HLA-DR2 (Quadro 2).

Quadro 2. Caracterização dos linfócitos T no PFE

Lin MS et al. (2000) ⁵⁴ Sangue periférico	Fenótipo: Linfócito T CD4 ⁺ de memória	Padrão citocinas : Th2- <i>like</i>	Restritos ao HLA-DR
Santi CG et al. (2001) ⁵⁰ <i>In situ</i>	Predominância de CD4 ⁺ na população de linfócitos T na derme	Ausência de expressão de ICAM-1 e HLA-DR nos queratinócitos (pele lesional e perilesional)	Diminuição das células de Langerhans na epiderme (pele lesional)

(Lin et al. J Clin Invest 2000: 105:207–213)

(Santi CG& Sotto MN. J Am Acad Dermatol 2001: 44(3):446-50)

Baseado nos estudos citados acima, este estudo imunoistoquímico foi desenvolvido visando avaliar o possível papel dos linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na pele de pacientes com PFE. Ainda, havia o intuito de analisar se as alterações quantitativas destes linfócitos poderiam estar envolvidos na patogênese do PFE em atividade, com interferência no prognóstico da doença.

Confirmando os achados prévios de Santi e Sotto ⁵⁰, o resultado deste estudo também demonstrou importante expressão de linfócitos T CD4⁺ *in situ* na pele de pacientes com PFE.

Neste mesmo estudo conduzido por Santi em 2001, os autores encontraram apenas poucos linfócitos expressando o marcador CD25 no infiltrado inflamatório dérmico, o que não está de acordo com os dados exibidos pelo presente estudo. Resultados demonstram uma expressiva densidade da população de linfócitos T CD25⁺ ($5,9 \times 10^{-5}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 7,2 \times 10^{-5}$, $p=0,008$), correspondendo a mais de um terço do número de linfócitos CD4⁺ no infiltrado dérmico ($16,9 \times 10^{-5}$ linfócitos/ $\mu\text{m}^2 \pm 14,0 \times 10^{-5}$, $p<0,001$). Esta discrepância com os dados exibidos pelo estudo prévio pode ser explicada tanto por diferenças técnicas, como pela diversidade na gravidade dos casos de PFE selecionados, uma vez que no estudo de Santi e Sotto, o número de casos com formas localizadas da doença foi superior.

A expressão aumentada na derme de linfócitos T CD4⁺ pode estar relacionada ao padrão de secreção de citocinas Th2 observado no PFE, como demonstrado em estudo prévio: um possível gatilho ambiental apresentando sequência homóloga com o domínio extracelular 5 (EC-5) da Dsg 1 poderia levar à formação de auto-anticorpos. Assim, em indivíduos geneticamente suscetíveis, ocorre o fenômeno de *epitope spreading* intramolecular, e produção de auto-anticorpos patogênicos que reconhecem domínios distintos da Dsg 1 (EC-1 e EC-2), levando à acantólise⁵⁸ (Quadro 3).

A maior expressão de linfócitos CD25⁺ encontrada na pele de pacientes com PFE pode ser uma consequência da ativação celular transitória, e não necessariamente um marcador específico de linfócitos T regulatórios (Quadro 3).

A co-localização de CD4 e CD25, dois marcadores de membrana, não foi factível de ser realizada nas amostras de pele de pacientes de PFE utilizando a técnica de dupla marcação imunoistoquímica convencional. Assim, foi feita a tentativa de comprovar esta co-localização CD4CD25, utilizando-se para tal a microscopia confocal. Devido à fragilidade tecidual de nossas amostras de PFE, induzidas pela clivagem superficial, este recurso não pôde ser utilizado.

Quadro 3. Expressão linfocitária no infiltrado dérmico de pacientes com PFE no presente estudo

	DERME	DERME
Lago F et al. (2011)	<p>Maior número de linfócitos T CD4⁺ no infiltrado de PFE em relação aos controles (p<0,001)</p> <p>↓</p> <p>Podem estar relacionados ao padrão <i>Th2</i> de secreção de citocinas</p>	<p>Maior número de linfócitos T CD25⁺ no infiltrado de PFE em relação aos controles (p=0,008)</p> <p>↓</p> <p>Podem ser consequência da ativação transitória de linfócitos T</p>

De acordo com estudos prévios desenvolvidos no sangue periférico de pacientes com pênfigo vulgar, os linfócitos T regulatórios podem estar drasticamente reduzidos, com consequente diminuição da expressão de Foxp3 nos linfócitos T CD4⁺CD25⁺ (63). Curiosamente, estes autores não reproduziram os mesmos achados para o pênfigo foliáceo clássico, atribuindo este fato a uma redução na atividade, ao invés de alterações quantitativas dos linfócitos T regulatórios (Quadro 4).

Quadro 4. Linfócitos T CD4⁺CD25^{high} nos pênfigos

Sugiyama H et al (2007) ⁶³	Linfócitos Treg CD4 ⁺ CD25 ^{high} (sangue periférico)	Expressão de Foxp3
Pênfigo Vulgar	Reduzidos	Diminuída
Pênfigo Foliáceo Clássico	Não foi observada redução	—

(Sugiyama H et al. Dermatology 2007;214(3):210-220)

Ao analisarmos as amostras de pele dos pacientes com PFE neste estudo, esperávamos encontrar um padrão similar ao exibido nos doentes com PV, com redução tanto numérica como funcional dos linfócitos T regulatórios, e com reprodução destes achados *in situ* na pele com lesões de PFE em atividade. Entretanto, o maior achado nas amostras de pele de pacientes com PFE **foi a presença de aumentada expressão de linfócitos Foxp3⁺, linfócitos CD25⁺ e linfócitos CD25⁺Foxp3⁺ duplamente marcados na epiderme.** Na epiderme destes pacientes, não houve co-expressão aumentada de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺.

Assim, a detecção aumentada destes linfócitos que exibem a co-marcação CD25⁺Foxp3⁺, pode representar população de linfócitos diversa que exhibe o marcador Foxp3 e que desempenha atividade regulatória.

Quadro 5. Expressão linfocitária no infiltrado epidérmico de pacientes com PFE no presente estudo.

	EPIDERME	EPIDERME	EPIDERME
Lago F et al. (2011)	<p>Maior número de linfócitos T Foxp3⁺</p> <p>(PFE > controles) (p=0,04)</p>	<p>Maior número de linfócitos T CD25⁺</p> <p>(PFE > controles) (p=0,003)</p>	<p>Maior número de linfócitos T CD25⁺Foxp3⁺</p> <p>(PFE > controles) (p=0,007)</p>

↓

Podem representar outra classe de linfócitos com atividade supressora

Outras classes de linfócitos regulatórios são descritas na literatura, até mesmo apresentando expressão do marcador Foxp3. Cosmi et al.²⁸ identificaram no timo humano uma subpopulação de linfócitos CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ que compartilham atividade regulatória, achados fenotípicos e mecanismos de ação com os já consagrados linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Quadro 6. Linfócitos CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ com atividade regulatória

Cosmi et al (2003)²⁸	<p>População de linfócitos CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ com atividade regulatória</p>	<p>Compartilham fenótipo, características funcionais e mecanismos de ação com os linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺</p>	<p>Podem ser encontrados nas áreas do timo humano onde estão presentes os linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺</p>
--	---	--	---

(Cosmi L et al. Blood 2003;102(12):4107-4114)

No presente estudo foi feita a tentativa da caracterização destes linfócitos CD25⁺Foxp3⁺ como pertencentes ao contingente de linfócitos CD8⁺, mas não foi possível realizar esta imunomarcacão, uma vez que a fragilidade tecidual exibida no pênfigo foliáceo exigiu múltiplos cortes das amostras de pele, acabando por afastar-se da área original do infiltrado inflamatório de interesse.

Para o tempo de controle da doença e o infiltrado linfocitário, foi observada uma correlação inversa com o número de linfócitos T CD4⁺ na derme e uma correlação inversa com a expressão de linfócitos Foxp3⁺ dentro da epiderme, indicando uma possível ligação entre a magnitude do infiltrado CD4⁺ dérmico ou maior expressão de Foxp3 pelos linfócitos epidérmicos, e um melhor desfecho da doença.

6 Conclusões

Frente aos dados encontrados, concluimos em nosso estudo que:

1. Não observamos redução significativa dos linfócitos T regulatórios $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ na pele dos pacientes com pêfigo foliáceo endêmico.
2. Foi observado aumento significativo da expressão de linfócitos T $CD4^+$ e linfócitos T $CD25^+$ na derme de pacientes com pêfigo foliáceo endêmico em relação aos controles.
3. Houve um aumento significativo de linfócitos T $CD25^+Foxp3^+$ na epiderme de pacientes com pêfigo foliáceo endêmico em relação aos controles.
4. Com relação ao tempo de controle da doença (PFE), foi observada uma correlação inversa com o número de linfócitos $CD4^+$ na derme ($r=-0,449$, $p=0,036$), e uma correlação inversa com a expressão de linfócitos $Foxp3^+$ na epiderme ($r= -0,463$, $p=0,03$) nas biópsias de pele de pacientes com PFE.

ANEXO A. CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04.02.09, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1056/08**, intitulado: "**Perfil imunoistoquímico de linfócitos T regulatórios no pênfigo foliáceo endêmico através da expressão do marcador FOXP3**", apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Valéria Aoki**

Pesquisador (a) Executante : Fernanda Lago

CAPPesq, 09 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

ANEXO B. Termo de consentimento livre esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP****MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA. PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS NO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DO MARCADOR FOXP3.
2.
PESQUISADOR: DRA. VALÉRIA AOKI (pesquisador responsável) e DRA. FERNANDA LAGO (pesquisador executante)
CARGO/FUNÇÃO: PROFESSORA DOUTORA FMUSP (pesquisadora responsável) / MÉDICA PÓS GRADUANDA (pesquisadora executante) INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 60080/ Nº 123729
UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DERMATOLOGIA.
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Texto sugerido para leitura (TCLE)

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de uma pesquisa que tem como objetivo coletar informações sobre sua doença de pele (pênfigo foliáceo endêmico) , através de uma história clínica, um exame físico da pele e realização de exame de imunoistoquímica no bloco parafinado de amostra de pele estocado no laboratório de Dermatopatologia. Não haverá nenhuma modificação em seu tratamento, nem riscos e desconfortos esperados, já que utilizaremos somente o material de biópsia que já foi coletado previamente e está estocado no Laboratório de Dermatopatologia.

As informações que serão obtidas terão como objetivo um estudo mais aprofundado deste tipo de doença e poderá trazer informações importantes para cuidar melhor de pacientes como você. Ao final do estudo, estas informações serão publicadas e estarão à sua disposição.

Concordando em participar deste estudo, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá ser lido e devidamente entendido. Só assim, com a sua concordância, você irá assiná-lo e posteriormente, suas informações serão coletadas pelo médico.

- Garantia de acesso : Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra Valéria Aoki que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 255 ICHC 3º andar/São Paulo-(SP) Telefone (11)3069-6000 .Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

– Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

– Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

8 Referências

1. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2):S24-32.
2. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
3. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th ed. NewYork. Garland Publishing; 2001.
4. Girardi M. Cutaneous perspectives on adaptive immunity. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2007; 33:4-14.
5. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2):S33-40.
6. Schlienger K, Craighead N, Lee KP, Levine BL, June CH. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2000; 96:3490-98.
7. Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:45-51.
8. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1993; 10:561-91.

9. Mossmann TR, Coffman RL. T_H1 and T_H2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-73.
10. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 2009; 10(7):689-95.
11. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Supressor T cells. *J Immunol* 1972; 108: 586-90.
12. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-64.
13. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007; 2007:89195.
14. Shevach EM. Certified professionals: CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *J Exp Med* 2001; 193: F41-45.
15. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-61.
16. Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:744-50.
17. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-52.

18. Chatila TA. Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2009; 38: 265-72.
19. de Boer OJ, van der Loss CM, Teeling P, van der Wal AC, Teunissen MBM. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers Foxp3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 2007; 55(9):891-8.
20. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. Plasticity of CD4+Foxp3+ T cells. *Curr Opin Immunol* 2010; 21:281-5.
21. Roncador G, Brown PJ, Maestre L et al. Analysis of Foxp3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005;35:1681-91.
22. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25^{high} regulatory T cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.
23. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:68-77.
24. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001; 3(11):947-54.
25. Shevach EM. From vanilla to 28 flavours: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25:195-201.
26. Hahn BH, Pyare-Singh R, La Cava A, Ebling FM. Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFβ-secreting CD8+T cell suppressors. *J Immunol* 2005 (175):7728-37.

-
27. Gilliet M, Liu YJ. Generation of CD8 T regulatory cells by CD40 ligand activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002 (195):695-704.
28. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli B, Mazzinghi B, Santarlaschi V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 2003; 102:4107-44.
29. Fischer K, Voekl S, Heymann J, Przbylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schugart L, Schmidt CA, Andreessen R, Mackensen A. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8-double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005;105:2828-35.
30. Bos JD. Skin Immune System (SIS): cutaneous immunology and clinical immunodermatology, 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2004.
31. Streilein JW. Lymphocyte traffic, T cell malignancies and the skin. *J Invest Dermatol* 1978, 71(3):167-71.
32. Bos JD, Kapsenberg ML. The skin Immune system (SIS): its cellular constituents and their interactions. *Immunol Today* 1986; 7: 235.
33. Sontheimer RD. Perivascular dendritic macrophages as immunobiological constituents of the human dermal perivascular unit. *J Invest Dermatol* 1989; 93(2):96S-101S.
34. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4+CD25^{high} Foxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol* 2006; 177(7): 4488-94.

-
35. Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for T reg migration. *Trends immunol* 2005;26:632-36.
 36. Fine JD. Bullous Diseases. New York: Igaku-Shoin; 1993.
 37. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 7th edition. New York : Mc Graw Hill; 2008.
 38. Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed RA. Correlation of peptide and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris. A model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5239-43.
 39. Qian Y, Prysayahn P, Andraca E, Qaqish B, Aoki V, Hans-Filho G, et al. IgE, IgM, and IgG4 anti-desmoglein 1 autoantibody profile in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Invest Dermatol* 2011; 131(4):985-7.
 40. Culton DA, Qian Y, Li N, Rubenstein D, Aoki V, Filho GH, Rivitti EA, Diaz LA. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *J Autoimmun* 2008; 31(4): 311-24.
 41. Tozecka J D, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Waszczykowska E, Lukamowicz J, Pas H. Detection of pemphigus autoantibodies by IIF and ELISA tests in patients with pemphigus vulgaris and foliaceus and in healthy relatives. *Med Sci Monit* 2003; 9 (12): CR528-33.
 42. Hilario-Vargas J, Dasher DA, Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Santos V, Qaquish BF, Rivitti EA, Diaz LA. Prevalence of Anti-Desmoglein-3 Antibodies in Endemic Regions of Fogo Selvagem in Brazil. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2044-48.

43. Warren SJP, Lin MS, Giudice GJ, Hoffman RG, Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Santos V, Diaz LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. *N Engl J Med* 2000; 343: 23-30.
44. Hashimoto K, Lever WF. An electron microscopic study of pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 540-52.
45. Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, Diaz LA, Anhalt GJ. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice : A time course study of clinical, immunologic, ultrastructural and cytochemical changes. *J Invest Dermatol* 1985; 84:41-6.
46. Lever WF. Pemphigus and Pemphigoid. Springfield: Charles C Thomas Publishers; 1965.
47. Sami N, Bhol KC, Ahmed AR. Diagnostic features of pemphigus vulgaris in patients with pemphigus foliaceus: detection of both antibodies, long term follow-up and treatment responses. *Clin Exp Immunol* 2001;125: 492-8.
48. Salopek TG. Nikolsky's sign: is it 'dry' or is it 'wet'? *Br J Dermatol* 1997;136: 762-67.
49. Emmerson RW, Wilson-Jones E. Eosinophilic spongirosis in pemphigus. *Arch Dermatol* 1968; 97:252-7.
50. Santi CG, Sotto MN. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Am Acad Dermatol* 2001; 44(3): 446-50.

-
51. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; 306: 1189-96.
 52. Aoki V, Huang MHT, Périgo AM, Fukumori LMI, Maruta CW, Santi CG, Oliveira ZN, Rivitti E. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) and pemphigus vulgaris: immunoglobulin G heterogeneity detected by immunofluorescence. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004; 59(5): 251-56.
 53. Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964; 117: 505-10.
 54. Lin MS, Fu CL, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Moraes JR, Moraes ME, Lazaro AM, Giudice GJ, Stastny P, Diaz LA. Desmoglein-1-specific-T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus(fogo selvagem). *J Clin Invest* 2000;105:207-13.
 55. Gebhard KL, Veldman CM, Wassmuth R, Schultz E, Schuler G, Hertl M. Ex vivo analysis of desmoglein 1-responsive T-helper (Th)1 and Th2 cells in patients with pemphigus foliaceus and healthy individuals. *Exp Dermatol* 2005; 14:586-92.
 56. Hertl M, Veldman C. T-cellular autoimmunity against desmogleins in pemphigus, an autoantibody-mediated bullous disorder of the skin. *Autoimmun Rev* 2003;2:278-83.
 57. Veldman C, Gebhard K, Uter W, Wassmuth R, Grotzinger J, Schultz E, Hertl M. T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol* 2004; 172:3883-92.

-
58. Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med* 2003; 197:1501-10.
59. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol*. 1997;159:2010-7.
60. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 e 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999; 140:351-7.
61. Aoki V, Lago F, Yamazaki MH, Santi CG, Maruta CW, The cooperative group on fogo selva research. Significado do epitope spreading na patogênese dos pênfigos vulgar e foliáceo. *An Bras Dermatol* 2008; 83(2):157-61.
62. Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006;116:1159-66.
63. Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, Kawamura T, Kitamura R, Ando N, Shimada S. CD4⁺CD25^{high} Regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatology* 2007;214:210-20.
64. Veldman C, Hohne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2004; 172:6468-75.

-
65. Veldman C, Pahl A, Beissert S, Hansen W, Buer J, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory cells into th2-like cells. *J Immunol* 2006; 176:3215-22.
66. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311–323.
67. Franz B, Fritzsching B, Riehl A, Oberle N, Klemke CD, Sykora J, Quick S, Stumpf C, Hartmann M, Enk A, Ruzicka T, Krammer PH, Suri-Payer E, Kuhn A. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007;56(6):1910-20.
68. Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003; 112:1437–43.
69. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1643–56.
70. Campbell I, Reis V, Aoki V, Cunha P, Hans Filho G, Alves G, Rocha R, Friedman H. Pênfigo foliáceo endêmico/Fogo Selvagem. *An Bras Dermatol* 2001; 76:13-31.

-
71. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, Bystryn JC, Cianchini G, Diaz L, Fivenson D, Hall R, Harman KE, Hashimoto T, Hertl M, Hunzelmann N, Iranzo P, Joly P, Jonkman MF, Kitajima Y, Korman NJ, Martin LK, Mimouni D, Pandya AG, Payne AS, Rubenstein D, Shimizu H, Sinha AA, Sirois D, Zillikens D, Werth VP. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58(6):1043-6.
72. Roscoe J, Diaz L, Sampaio S, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, Patel H, Anhalt GJ. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol* 1985; 85:538-41.

APÊNDICE 1. Dados demográficos e clínicos dos sujeitos participantes do estudo

Caso	Idade	Gênero	Biópsia	QC	Uso CE	Comorbidade	TCD(m)	Desfecho
PFE1	49	M	dorso	G	N	asma	1	RP
PFE2	67	M	tórax	G	S	DCV	1	RE
PFE3	51	F	tórax	G	S	CA	2	RP
PFE4	17	M	face	L	S	bronquite		24 RC
PFE5	24	F	dorso	L	S	HAS	1	RC
PFE6	59	F	dorso	G	N	HAS	6	RP
PFE7	38	F	dorso	G	N	HAS	2	RC
PFE8	19	F	abdome	G	N	—	1	RC
PFE9	38	M	dorso	G	N	—	12	RC
PFE10	21	M	MS	G	N	—	4	RC
PFE11	59	F	MS	G	N	HAS	7	RC
PFE12	17	M	tórax	G	N	bronquite	10	RC
PFE13	43	M	MI	G	S	artrite	2	RP
PFE14	16	F	dorso	G	S	—	24	RC
PFE15	49	F	dorso	G	N	HAS	5	RE
PFE16	28	M	dorso	G	N	—	5	RP
PFE17	23	M	dorso	G	N	—	1	RP
PFE18	53	M	abdome	G	N	DLP	12	RP
PFE19	29	F	dorso	G	N	—	12	RP
PFE20	56	F	face	G	N	DM	1	RP
PFE21	48	F	MS	G	N	—	1	RE
PFE22	66	F	dorso	G	N	—	1	RP
CTL1	42	M	tórax	—	—	—	—	—
CTL2	29	F	tórax	—	—	—	—	—
CTL3	28	F	abdome	—	—	—	—	—
CTL4	34	F	tórax	—	—	—	—	—
CTL5	47	M	face	—	—	—	—	—
CTL6	52	M	abdome	—	—	—	—	—
CTL7	24	F	MS	—	—	—	—	—
CTL8	40	F	abdome	—	—	—	—	—
CTL9	60	M	MI	—	—	—	—	—
CTL10	46	F	tórax	—	—	—	—	—

*PFE: Pênfigo Foliáceo Endêmico, CTL: Controle, M: Masculino, F: Feminino, QC: Quadro Clínico, G: Generalizado, L: Localizado, CE: Corticosteróides, N: Não, S: Sim, HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica, DCV: Doença Cardiovascular, DLP: Dislipidemia, DM: *Diabetes Mellitus*, TCD Tempo de Controle da Doença, RP: Remissão Parcial, RC: Remissão Completa, RE: Recidiva, (-) nenhum.

APÊNDICE 2. Quantificação do número de linfócitos imunomarcados por unidade de área na derme de pacientes com PFE e controles.

Caso	Foxp3 ⁺ /área	CD4 ⁺ /área	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /área	CD25 ⁺ /área	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /área
PFE1	0,0001216	0,0003959	0,0001280	0,0002376	0,0000741
PFE2	0,0001695	0,0001993	0,0001680	0,0001178	0,0001354
PFE3	0,0000903	0,0000585	0,0000160	0,0000108	0,0000288
PFE4	0,0000689	0,0003337	0,0000330	0,0002765	0,0000341
PFE5	0,0000327	0,0006185	0,0000239	0,0001058	0,0000163
PFE6	0,0000490	0,0001917	0,0000120	0,0000579	0,0000231
PFE7	0,0000259	0,0000712	0,0000171	0,0000163	0,0000163
PFE8	0,0000304	0,0000610	0,0000193	0,0000503	0,0000287
PFE9	0,0000172	0,0000942	0,0000067	0,0001289	0,0000107
PFE10	0,0000180	0,0001496	0,0000079	0,0000366	0,0000163
PFE11	0,0000131	0,0000607	0,0000081	0,0000183	0,0000073
PFE12	0,0000101	0,0000799	0,0000000	0,0000152	0,0000061
PFE13	0,0000096	0,0000710	0,0000000	0,0000312	0,0000255
PFE14	0,0000105	0,0000039	0,0000000	0,0000157	0,0000000
PFE15	0,0000095	0,0001073	0,0000077	0,0000406	0,0000074
PFE16	0,0000066	0,0001168	0,0000069	0,0000037	0,0000111
PFE17	0,0000103	0,0001954	0,0000038	0,0000432	0,0000000
PFE18	0,0000071	0,0000632	0,0000070	0,0000101	0,0000067
PFE19	0,0000039	0,0001277	0,0000000	0,0000231	0,0000000
PFE20	0,0000036	0,0002339	0,0000000	0,0000286	0,0000000
PFE21	0,0000000	0,0002406	0,0000120	0,0000290	0,0000058
PFE22	0,0000000	0,0002452	0,0000000	0,0000165	0,0000041
CTL1	0,0000467	0,0000509	0,0000150	0,0000133	0,0000239
CTL2	0,0000436	0,0000638	0,0000106	0,0000095	0,0000238
CTL3	0,0000309	0,0000161	0,0000081	0,0000326	0,0000119
CTL4	0,0000240	0,0000514	0,0000086	0,0000074	0,0000098
CTL5	0,0000240	0,0000289	0,0000105	0,0000000	0,0000207
CTL6	0,0000178	0,0000230	0,0000102	0,0000182	0,0000121
CTL7	0,0000116	0,0000367	0,0000052	0,0000253	0,0000076
CTL8	0,0000082	0,0000289	0,0000048	0,0000051	0,0000101
CTL9	0,0000087	0,0000400	0,0000073	0,0000033	0,0000132
CTL10	0,0000032	0,0000302	0,0000000	0,0000234	0,0000000

*PFE: Pênfigo Foliáceo Endêmico, CTL: Controle. (área: μm^2)

APÊNDICE 3. Quantificação do número de linfócitos imunomarcados por unidade de área na epiderme de pacientes com PFE e controles.

Caso	Foxp3 ⁺ /área	CD4 ⁺ /área	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /área	CD25 ⁺ /área	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /área
PFE1	0,0000835	0,0000640	0,0000576	0,0000614	0,0000341
PFE2	0,0000118	0,0000000	0,0000000	0,0000063	0,0000375
PFE3	0,0000602	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000104
PFE4	0,0000151	0,0000000	0,0000000	0,0000095	0,0000286
PFE5	0,0000035	0,0000111	0,0000000	0,0000827	0,0000075
PFE6	0,0000000	0,0000105	0,0000000	0,0000075	0,0000000
PFE7	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000628	0,0000000
PFE8	0,0000084	0,0000000	0,0000000	0,0000071	0,0000142
PFE9	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000048
PFE10	0,0000230	0,0000000	0,0000060	0,0000141	0,0000071
PFE11	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000095	0,0000000
PFE12	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
PFE13	0,0000083	0,0000000	0,0000000	0,0000100	0,0000100
PFE14	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
PFE15	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
PFE16	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
PFE17	0,0000138	0,0000000	0,0000000	0,0000650	0,0000072
PFE18	0,0000000	0,0000142	0,0000000	0,0000367	0,0000000
PFE19	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000075	0,0000000
PFE20	0,0000049	0,0000000	0,0000000	0,0000320	0,0000000
PFE21	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000075	0,0000000
PFE22	0,0000000	0,0000063	0,0000000	0,0000077	0,0000000
CTL1	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL2	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL3	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000099	0,0000000
CTL4	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL5	0,0000000	0,0000131	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL6	0,0000061	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL7	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL8	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL9	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000
CTL10	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,0000000

*PFE: Pênfigo Foliáceo Endêmico, CTL : Controle.(área: μm^2)