KARINA LOPES MORAIS

**Pênfigo herpetiforme : avaliação de citocinas pró-inflamatórias
da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na
interleucina-31 (IL-31) e seu receptor IL-31RA**

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. Valeria Aoki

**São Paulo
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Morais, Karina Lopes

Pênfigo herpetiforme: avaliação de citocinas pró-inflamatórias da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na interleucina-31 (IL-31) e seu receptor IL-31RA / Karina Lopes Moraes. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Valéria Aoki.

Descritores: 1.Pênfigo 2.Desmogleínas 3.Imuno-histoquímica 4.Acantólise 5.Receptores de interleucina 6.Eosinófilos

USP/FM/DBD-005/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

FICHA DE AVALIAÇÃO

MORAIS, KARINA L

Titulo: Pênfigo herpetiforme: avaliação de citocinas pró-inflamatórias da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na interleucina-31 (IL-31) e seu receptor IL-31RA.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha filha e mais novo amor **Maitê**, que ainda em meu ventre, me impulsionou a dar os últimos passos para a finalização desta tese.

Ao meu marido **Guto**, meu companheiro de uma jornada já longa, por ter alcançado cada vitória ao meu lado, e por ter me dado suporte nos momentos árdusos, por ser meu amor e meu porto seguro, por me incentivar a ser forte e determinada e a dar o meu melhor, por me orgulhar e me fazer feliz todos os dias.

Aos meus pais **Heliodoro** e **Maria Gislane**, minhas fortalezas, pelo amor e suporte incondicionais, pelo cuidado, pelo zelo, pelo estímulo, pelo colo. Vocês são os meus maiores incentivadores, meus maiores exemplos de força e determinação. Por vocês, nutro um orgulho imensurável!

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Valeria Aoki, exemplo de competência e sabedoria, por me aceitar como sua aluna e me inspirar na prática acadêmica. Obrigada pelos ensinamentos na vida profissional, e também na vida pessoal, pela amizade, pelo comprometimento, pela disponibilidade, pela ajuda, por ter sido presente durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Denise Miyamoto, com a qual tive o prazer de conviver e aprender desde o primeiro mês da minha residência médica. Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos, pela generosidade, pela paciência, por ter me impulsionado a iniciar este projeto e por ter me dado grandes oportunidades profissionais.

Às Profas. Dras. Celina Maruta e Cláudia Santi, e toda equipe do ambulatório de dermatoses bolhosas autoimunes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), pelo apoio e ensinamento, pelas contribuições com minha tese, pelo comprometimento e respeito aos pacientes.

À Profa. Dra. Raquel Leão, por ter me ensinado pacientemente a realizar os testes estatísticos e as representações gráficas, pelo incentivo e por toda a ajuda na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Neusa Valente, com a qual tenho a satisfação de conviver, por ter me ajudado em tantos momentos da minha vida profissional e pessoal, por ter me auxiliado na revisão histopatológica deste trabalho. Tenho uma

imensa gratidão por sua amizade e uma grande admiração pela médica e professora que você é.

À Profa. Dra. Mirian Sotto, pelo empenho em solucionar minhas dúvidas e garantir a qualidade dos meus testes imuno-histoquímicos.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, que com paciência e dedicação, me transferiu todos os ensinamentos necessários para a leitura e quantificação dos resultados imuno-histoquímicos, essenciais para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56) do Instituto de Medicina Tropical do HCFMUSP, em especial Naiura, Yasmin, Luciana e Lucas, por terem me ajudado prontamente em várias etapas do meu trabalho.

Ao HCFMUSP, aos amigos incríveis que a residência médica me trouxe, e aos professores com os quais tive o privilégio de aprender.

À equipe do ambulatório de tricologia do HCFMUSP, e às queridas amigas Andréia Munck, Maria Júlia, Alessandra Anzai, Carolina Fachine e Camila Gaviolli, pelo incentivo, pelos conselhos, e pelo convívio.

Aos meus tantos familiares e bons amigos, que indiretamente participaram desde projeto, por sempre me apoiarem e confiarem em mim.

Aos professores da banca examinadora, pela participação nesta etapa de conclusão do doutorado, tão importante na minha trajetória.

Aos pacientes, por permitirem com satisfação a realização deste estudo.

“Vencer, mais do que o simples enfrentamento de obstáculos, é saber o momento de contorná-los e seguir em frente sem desviar-se dos seus objetivos”.

Heliodoro Moraes

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	Gerais	2
2.2	Específicos.....	2
3	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Pênfigo Herpetiforme	4
3.1.1	Histórico e epidemiologia.....	4
3.1.2	Aspectos clínicos do PH	7
3.1.3	Aspectos diagnósticos do PH	10
3.1.3.1	Histopatologia do PH.....	10
3.1.3.2	Aspectos imunológicos.....	13
3.1.3.3	Critérios diagnósticos	14
3.1.4	Curso e Tratamento do PH	15
3.1.5	Etiopatogenia do PH.....	17
3.2	Resposta imune adaptativa cutânea	21
3.2.1	Interleucina-31	23
3.2.1.1	Interleucina-31: biologia molecular e funções.....	23
3.2.1.2	Interleucina-31 e pele.....	25
4	MÉTODOS.....	27
4.1	Casuística	27
4.1.1	Critérios de inclusão	27
4.1.2	Critérios de exclusão	28
4.2	Avaliação demográfica e laboratorial.....	28
4.3	Avaliação do prurido nos pacientes com PH, PF e PV	29
4.4	Avaliação histopatológica.....	30
4.5	Técnica de imuno-histoquímica.....	30
4.6	Análise de imagem e quantificação das marcações IH	33
4.7	Fluxograma do estudo.....	35
4.8	Análise estatística	36

5	RESULTADOS	37
5.1	Análise das variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais	37
5.1.1	Dados demográficos e clínicos dos pacientes com PH.....	37
5.1.2	Dados imunohistopatológicos dos pacientes com PH.....	40
5.1.3	Dados demográficos dos controles com PF e PV	42
5.1.4	Avaliação do prurido nos pacientes com PH e nos grupos de PF e PV	42
5.1.5	Avaliação da contagem de eosinófilos no sangue dos pacientes com PH e nos grupos de PF e PV	44
5.1.6	Avaliação dos níveis séricos de IgE nos pacientes com PH e nos grupos de PF e PV	45
5.2	Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica	46
5.2.1	Análise da expressão cutânea da IL-31	46
5.2.2	Análise da expressão cutânea do IL31-RA	49
5.2.3	Análise da expressão cutânea de IL-31 e IL-31RA em fases evolutivas distintas nos pacientes com PH	52
5.2.4	Análise da expressão cutânea da IL-4	53
5.2.5	Análise da expressão cutânea da IL-17	56
5.2.6	Análise da expressão cutânea do TNF α	59
5.3	Análises de correlação considerando as variáveis clínicas e laboratoriais entre si, e comparadas à expressão cutânea de IL-31 e IL-31 RA nos pacientes com pênfigo herpetiforme.....	62
5.4	Análises de correlação entre as expressões cutâneas dos marcadores IH no pênfigo herpetiforme	63
5.4.1	Análise de correlação entre a expressão cutânea de IL-4, e as expressões de IL-31 e IL-31RA no pênfigo herpetiforme	63
5.4.2	Análise da correlação entre a expressão cutânea de IL-17, e as expressões de IL-31 e IL-31RA no pênfigo herpetiforme	64
5.4.3	Análise da correlação entre a expressão cutânea de TNF α , e as expressões de IL-31 e IL-31RA no pênfigo herpetiforme	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	80
8	ANEXOS	82
9	REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT/PI3K	<i>Protein kinase B / Phosphoinositide 3-kinase</i>
AP:	Anatomopatológico
C3:	Complemento 3
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD20:	<i>Cluster differentiation 20</i>
CLA:	<i>Cutaneous lymphocyte associated antigen</i>
CS:	Controles com pele sã
DA:	Dermatite atópica
DBAI:	Dermatoses bolhosas autoimunes
DCA:	Dermatite de contato alérgica
DDS:	Dapsone
DH:	Dermatite herpetiforme
DLC:	Divisão de Laboratório Central
DMC:	Densidade média de cor
DP:	Desmoplaquina
Dsc:	Desmocolina
Dsg:	Desmogleína
EE:	Espongiose eosinofílica
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HC:	Healthy skin controls
HCFMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE:	Hematoxilina-eosina
IF:	Imunofluorescência
IFD:	Imunofluorescência direta
IFI:	Imunofluorescência indireta
IFN- γ :	Interferon gama

IgA:	Imunoglobulina A
IgE:	Imunoglobulina E
IgG:	Imunoglobulina G
IH:	Imuno-histoquímica
IL:	Interleucina
IL-31RA:	IL-31 <i>receptor alpha</i>
IOD:	<i>Integrated Optic Density</i>
JakSTAT:	<i>Janus kinase / Signal transducer and activator transcription</i>
LIM 56:	Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão
OSMR:	<i>Oncostatin M receptor beta</i>
PCR:	Reação de polimerase em cadeia
PB:	Penfigóide bolhoso
PF:	Pênfigo foliáceo
PG:	Placoglobina;
PH:	Pênfigo herpetiforme
PP:	Placofilina;
PV:	Pênfigo vulgar
RNAm:	Ácido ribonucleico mensageiro
TARC:	<i>Thymus and activation-regulated chemokine</i>
Tfh:	<i>T follicular helper</i>
TGF-β:	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th:	<i>T helper</i>
TNFα:	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg:	T regulatória
UCE:	Urticária crônica espontânea
ZMB:	Zona de membrana basal

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
°C	Graus Celsius
n	Tamanho da amostra
+	Positivo
-	Negativo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
UI	Unidade internacional
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quadro clínico do pênfigo herpetiforme	7
Figura 2: Quadro clínico do pênfigo herpetiforme.....	8
Figura 3: Pênfigo herpetiforme manifestando-se no curso de um pênfigo foliáceo.....	9
Figura 4: Pênfigo herpetiforme manifestando-se no curso de um pênfigo vulgar	10
Figura 5: Aspectos histopatológicos do pênfigo herpetiforme	12
Figura 6: Imunofluorescência direta no pênfigo herpetiforme.....	13
Figura 7: Desmossoma.....	18
Figura 8: Estrutura e epítomos das desmogleínas.	20
Figura 9: Fenótipos e funções das subpopulações de células T CD4 ⁺	22
Figura 10: Ilustração da escala analógica visual utilizada para avaliar a intensidade referida do prurido nos pacientes com pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar	29
Figura 11: Comparação da intensidade referida do prurido entre os pacientes com pênfigo herpetiforme e os grupos com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar, através da VAS	43
Figura 12: Comparação entre a contagem sanguínea de eosinófilos nos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nos grupos de pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar	44
Figura 13: Comparação dos níveis séricos de IgE entre os pacientes com pênfigo herpetiforme, e os casos de pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar	45
Figura 14: Imuno-histoquímica com anti-IL-31 nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400)	47
Figura 15: Comparação entre a expressão de IL-31 na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.....	48
Figura 16: Imuno-histoquímica com anti-IL-31RA nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de expressão membranoso, x400).....	50

Figura 17: Comparação entre a expressão de IL-31RA na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.....	51
Figura 18: Análise da expressão cutânea de IL-31 e de IL-31 RA em fases evolutivas distintas de 4 pacientes com pênfigo herpetiforme	53
Figura 19: Imuno-histoquímica com anti-IL-4 nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400)	54
Figura 20: Comparação entre a expressão de IL-4 na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.....	55
Figura 21: Imuno-histoquímica com anti-IL-17 nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400)	57
Figura 22: Comparação entre a expressão de IL-17 na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.....	58
Figura 23: Imuno-histoquímica com anti-TNF α nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400).....	60
Figura 24: Comparação entre a expressão de TNF α na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.....	61
Figura 25: (A) Correlação positiva entre contagem sanguínea de eosinófilos e intensidade do prurido (VAS) nos pacientes com pênfigo herpetiforme. (B) Ausência de correlação entre contagem sanguínea de eosinófilos e níveis séricos de IgE nos pacientes com pênfigo herpetiforme.	63
Figura 26: Análises de correlação entre as expressões de IL-4, IL-17 e TNF α , e a expressão de IL-31RA na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios diagnósticos propostos para o pênfigo herpetiforme	15
Tabela 2: Dados demográficos dos pacientes com pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar	38
Tabela 3: Classificação evolutiva dos pacientes com pênfigo herpetiforme no momento final do presente estudo.	40
Tabela 4: Achados histopatológicos e de imunofluorescência dos pacientes com pênfigo herpetiforme	41
Tabela 5: Médias e desvios-padrão da intensidade do prurido e das dosagens de IgE sérica e eosinófilos sanguíneos dos pacientes com pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Séries de casos publicadas de pênfigo herpetiforme	6
Quadro 2: Relação e especificações dos anticorpos primários utilizados na avaliação dos espécimes de pele de pacientes de pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e nas peles sãs.....	32
Quadro 3: Resumo dos resultados na comparação da intensidade do prurido, da contagem sanguínea de eosinófilos, e dos níveis séricos de IgE entre os pacientes com pênfigo herpetiforme e aqueles com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.....	46
Quadro 4: Resumo dos resultados com significância estatística na comparação da expressão de IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-17 e TNF α na pele de doentes com pênfigo herpetiforme e nas peles sãs e de doentes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar	62
Quadro 5: Resumo das análises de correlação das variáveis clínicas, laboratoriais e de imuno-histoquímica dos pacientes com pênfigo herpetiforme	66
Quadro 6: Comparação entre as características clínicas , laboratoriais e evolução dos pacientes com pênfigo herpetiforme publicados na literatura vs. dados do presente estudo	73
Quadro 7: Comparação entre os achados imuno-histoquímicos do presente estudo vs. as descrições da literatura.....	79

RESUMO

Morais KL. *Pênfigo herpetiforme: avaliação de citocinas pró-inflamatórias da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na interleucina-31 (IL-31) e seu receptor IL31-RA* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: Pênfigo herpetiforme (PH) é uma variante rara do grupo das dermatoses bolhosas autoimunes intraepidérmicas. Caracteriza-se por eritema urticariforme pruriginoso, com ou sem vesículas agrupadas, e espongiose eosinofílica. Acantólise é leve ou ausente, diferentemente dos pênfigos clássicos, e a imunofluorescência confirma o diagnóstico. A etiopatogenia permanece parcialmente elucidada, dificultando tratamentos eficazes para o PH. **OBJETIVOS:** Os objetivos deste estudo foram: caracterização demográfica, clínica, laboratorial e imunopatológica do PH, e avaliação da resposta imune adaptativa cutânea do PH, com ênfase na expressão da interleucina-31 (IL-31) e do seu receptor IL-31RA (IL-31 *receptor alpha*) por imuno-histoquímica (IH). **MÉTODOS:** Este foi um estudo comparativo, observacional, retrospectivo/prospectivo. Foram incluídos 25 pacientes com PH, e três grupos-controle: pênfigo foliáceo (PF, n=14), pênfigo vulgar (PV, n=15), e controles com pele sã (CS, n=10). Os dados demográficos e laboratoriais foram obtidos por análise de prontuário, a intensidade do prurido foi medida através da escala analógica visual (VAS), e os fragmentos de pele previamente obtidos por biópsia cutânea foram submetidos à análise anatomopatológica, imunofluorescência direta e IH, utilizando anticorpos anti-IL-31, anti-IL-31RA, anti-IL-4, anti-IL17 e anti-TNF α . Foram realizados o teste estatístico de Mann-Whitney e a correlação de Spearman, com o software *GraphPadPrism* 8.0. **RESULTADOS:** O PH predominou nas mulheres (19/25, 76%), com média de idade de 51,28 anos. Os dados laboratoriais revelaram eosinofilia em 6/25 (24%), IgE sérica aumentada em 14/19 (73,7%), e acantólise em 17/25 (68%) dos pacientes com PH. O VAS e a contagem sanguínea de eosinófilos foram superiores no PH em relação ao PF ($p<0,0001$ e $p=0,0097$) e ao PV ($p<0,0001$ para ambos), com correlação positiva entre o VAS e a contagem sanguínea de eosinófilos no PH ($p=0,0040$). Os níveis de IgE sérica foram mais elevados no PH comparados aos do PV ($p=0,0012$). A expressão cutânea de IL-31 foi superior nos pacientes de PH em relação aos de PF (epiderme: $p=0,0045$; derme: $p=0,0196$), e aos de PV (epiderme, $p=0,0404$), e semelhante ao PV na derme ($p=0,1254$), e aos CS (epiderme: $p=0,0548$; derme: $p=0,0812$). Houve maior expressão de IL-31RA na epiderme e derme dos pacientes com PH em relação ao PF ($p=0,0002$ em ambas); ao PV ($p=0,0433$, e $p=0,0090$) e aos CS ($p<0,0001$ em ambas). Quando analisamos um grupo de pacientes de PF que evoluiu para PH, houve aumento significativo da sua marcação epidérmica ($p=0,0286$). IL-4 foi mais expressa na epiderme e derme dos pacientes de PH do que nos de PF ($p=0,0004$, e $p=0,0029$), e na epiderme em relação aos de PV ($p=0,0138$). A marcação epidérmica de IL-17 foi maior nos pacientes de PH do que naqueles de PF ($p=0,0025$) e de PV ($p=0,0052$), e a expressão epidérmica de TNF α foi superior nos doentes de PH em relação aos de PF ($p=0,0008$). Nos pacientes com PH, houve correlação positiva entre as marcações epidérmicas de IL-4 vs. IL-31RA ($p=0,0024$), IL-17 vs. IL-31RA ($p=0,0017$), e TNF α vs. IL-31RA ($p=0,025$); e entre as marcações dérmicas de IL-4 vs. IL-31RA ($p=0,0134$), e IL-17 vs. IL-31RA ($p=0,0042$). **CONCLUSÕES:** Os resultados sugerem que a resposta inflamatória no PH seja predominantemente Th2 mediada, mas dependente do balanço

de outras citocinas pró-inflamatórias. As vias de sinalização da IL-31 parecem participar do processo etiopatogênico do PH, notadamente à custa da maior expressão cutânea do seu receptor IL-31RA, o que motiva estudá-lo como alvo terapêutico para o PH.

Descritores: Pênfigo; Desmogleínas; Imuno-histoquímica; Acantólise; Receptores de interleucina; Eosinófilos.

SUMMARY

Morais KL. *Pemphigus herpetiformis: analysis of proinflammatory cytokines of the adaptive cutaneous immune response, with emphasis on interleukin-31 (IL-31) and its receptor IL-31RA* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: Pemphigus herpetiformis (PH) is a rare variant within the pemphigus group and differs from the classic forms due to specific clinical and histologic features. Urticarial lesions and vesicles in herpetiform distribution with prominent pruritus are observed, and eosinophilic spongiosis is the main histopathologic finding, while acantholysis is mild or absent. Direct and/or indirect immunofluorescences are determinant for its diagnosis. Many aspects of the pathogenesis of PH remain undetermined, and still insufficient to ensure effective therapeutic approaches.

OBJECTIVES: The aims of this study were to characterize the demographic, clinical, laboratory and immunohistopathologic features of PH and to evaluate the cutaneous expression of interleukin-31 (IL-31) and IL-31RA (IL-31 receptor alpha) in patients with PH by immunohistochemistry (IH).

METHODS: This was a comparative, retrospective/prospective study, including 25 patients with PH, and three control groups: pemphigus foliaceus (PF, n=14), pemphigus vulgaris (PV, n=15), and healthy skin controls (HC, n=10). Demographic and laboratory data were obtained through medical records, severity of pruritus was analyzed by the visual analogue scale (VAS), and cutaneous specimens were obtained by skin biopsy and analyzed by histopathology, direct immunofluorescence and IH, utilizing anti-IL-31, anti-IL-31RA, anti-IL-4, anti-IL17 and anti-TNF α antibodies. Mann-Whitney test and Spearman correlation were performed for statistical analysis, using the GraphPadPrism 8.0 software. **RESULTS:** PH was more prevalent in females (19/25, 76%), with a mean age of 51.28 years. Main data revealed eosinophilia in 6/25 (24%), increased serum IgE in 14/19 (73.7%), and acantholysis in 17/25 (68%). There was a positive correlation of VAS and blood eosinophil count in PH patients ($p=0.0040$), and both were higher in PH than in PF ($p<0.0001$ and $p=0.0097$) and PV (both $p<0.0001$) patients. Serum IgE in PH was higher than in PV patients ($p=0.0012$). Cutaneous IL-31 expression in PH patients was higher than in PF (epidermis: $p=0.0045$; dermis: $p=0.0196$), and PV patients (epidermis, $p=0.0404$), and similar to PV patients (dermis, $p=0.1254$), and to HC (epidermis: $p=0.0548$; dermis: $p=0.0812$). IL-31RA expression in PH skin was higher than in all groups in epidermis and dermis (HC: both $p<0.0001$; PF: both $p=0.0002$; PV: $p=0.0433$, and $p=0.0090$). When analyzing PF patients that evolved to PH, we noted IL-31RA increased epidermal expression ($p=0.0286$). IL-4 was more expressed in PH than in PF (epidermis: $p=0.0004$; dermis: $p=0.0029$) and also in PV epidermis ($p=0.0138$). Epidermal IL-17 analysis in PH patients was statistically higher than PF ($p=0.0025$) and PV ($p=0.0052$), and epidermal TNF α was more expressed in PH than in PF ($p=0.0008$) patients. In PH patients, positive correlations were found between epidermal expressions of IL-4 vs. IL-31RA ($p=0.0024$), IL-17 vs. IL-31RA ($p=0.0017$), and TNF α vs. IL-31RA ($p=0.025$); and between dermal expressions of IL-4 vs. IL-31RA ($p=0.0134$), and IL-17 vs. IL-31RA ($p=0.0042$). **CONCLUSIONS:** The results suggest that PH is predominantly Th2 mediated, but dependent on the balance of other proinflammatory cytokines. IL-31 signaling pathways

seem to play a relevant role in PH pathogenesis, with emphasis on the augmented *in situ* expression of its receptor, IL-31RA. Those findings support future studies to clarify the role of anti-IL-31 pathway as therapeutic target for patients with PH.

Descriptors: Pemphigus; Desmogleins; Immunohistochemistry; Acantholysis; Receptors, interleukin; Eosinophils.

1 INTRODUÇÃO

Pênfigo refere-se ao grupo de doenças bolhosas da pele, mucosas e anexos cutâneos causadas pela agressão autoimune a componentes da adesão intercelular intraepitelial, especialmente às desmogleínas (Dsg), desmoplaquinas e desmocollinas (Dsc) (1). Classicamente, verifica-se acantólise intraepidérmica ao exame anatomopatológico (AP), e os testes de imunofluorescência (IF) evidenciam autoanticorpos depositados na pele ou circulantes (2, 3).

Os dois tipos mais prevalentes de pênfigo são o pênfigo vulgar (PV) e pênfigo foliáceo (PF) (4). As duas formas diferenciam-se pelos antígenos-alvo envolvidos, pelo nível de clivagem intraepidérmica e pela apresentação clínica (5). O PF apresenta comprometimento cutâneo exclusivo devido à produção de anticorpos contra a Dsg1, e pode ocorrer na forma esporádica ou endêmica, também conhecida como fogo selvagem (6, 7). Já o PV apresenta duas variantes: a forma mucosa, com produção de anticorpos contra Dsg3, e a mucocutânea, com presença concomitante de anticorpos contra Dsg1 e Dsg3 (8, 9).

Formas mais raras de pênfigo incluem o pênfigo herpetiforme (PH) (10, 11), o pênfigo vegetante (12), o pênfigo por IgA (13), o pênfigo paraneoplásico (14), o pênfigo induzido por medicamentos e o pênfigo por IgG/IgA (5, 15).

O PH é considerado uma variante clínica do PF ou do PV (16), e manifesta-se com características clínicas e imunohistopatológicas distintas. O entendimento escasso dos mecanismos imunes específicos que culminam com a expressão clínica do PH dificultam o seguimento e manejo terapêutico desses pacientes. Isto posto, torna-se de relevância o estudo do perfil da expressão de interleucinas e mediadores inflamatórios que possam exercer papel etiopatogênico no PH, visando a busca de alvos terapêuticos específicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar a expressão na pele da IL-31 (interleucina-31) e de outros mediadores inflamatórios da resposta imune adaptativa cutânea no PH, sendo eles: IL-31RA (IL-31 *receptor alpha*), IL-4 (interleucina-4), IL-17 (interleucina-17) e TNF α (*tumor necrosis factor alpha*).

2.2 Específicos

- Caracterizar os dados demográficos, clínicos, tratamentos realizados e dados evolutivos no PH;
- Descrever os aspectos histopatológicos e imunológicos dos pacientes com PH;
- Avaliar a presença e intensidade do prurido, níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) e contagem de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes com PH, e compará-los aos dos pacientes com PF e PV;
- Demonstrar e comparar o perfil de expressão da IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-17, e TNF α na pele dos seguintes grupos:
 - Pacientes com PH;
 - Pacientes com PF;
 - Pacientes com PV;
 - Controles com pele sã (CS);

-
- Correlacionar a gravidade do prurido, os níveis séricos de IgE, a contagem de eosinófilos no sangue periférico e os títulos da imunofluorescência indireta (IFI) observados nos doentes com PH, com a expressão da IL-31 e IL-31RA na pele desses pacientes, no intuito de se identificarem potenciais marcadores prognósticos e diagnósticos do PH;
 - Correlacionar a gravidade do prurido, os níveis séricos de IgE, a contagem de eosinófilos no sangue periférico e os títulos da IFI observados nos doentes com PH entre si, no intuito de se identificarem potenciais marcadores prognósticos ou que reflitam atividade de doença;
 - Correlacionar a expressão de IL-31 e IL-31RA com a de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-17, e TNF α na pele dos pacientes com PH.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pênfigo Herpetiforme

3.1.1 Histórico e epidemiologia

O termo PH foi originalmente proposto por Jablonska *et al.* em 1975 (17) para descrever o caso de um paciente que apresentava características clínicas semelhantes às da dermatite herpetiforme (DH), porém com achados imunopatológicos sugestivos de pênfigo. Outros autores já haviam descrito casos semelhantes, sob denominações diversas: dermatite acantolítica herpetiforme, PF herpetiforme, DH com acantólise, doença bolhosa mista ou pênfigo responsivo a sulfonamida (18-22). Todos os relatos possuíam em comum quadro clínico similar à DH, associado à presença de acantólise e/ou espongiose eosinofílica (EE) no exame AP. Emmerson *et al.* já haviam apresentado o conceito de que a EE poderia ser um achado histológico precoce dos pênfigos, podendo preceder a acantólise característica em alguns casos (23). Três dos sete pacientes descritos com EE isolada em quadros iniciais de pênfigo demonstravam lesões clínicas atípicas, e possivelmente correspondiam a quadros de PH não diagnosticados à época (23).

Cerca de 150 casos de PH foram publicados em diversos países (16, 24-30), e as descrições contemplam relatos de PH de forma isolada, ou durante o curso evolutivo de PF ou PV. Das oito séries de casos de PH na literatura mundial (Quadro 1), três são de áreas endêmicas de PF – uma série descrita no Brasil e duas na Tunísia (16, 27).

A incidência do PH varia de 4 a 7% de todos os casos de pênfigo, segundo a maioria dos autores (24, 31, 32). Observa-se predomínio de PH nos caucasianos entre a quinta e sexta décadas de vida, com média de idade ao diagnóstico de 53 anos, e raros relatos em crianças (11, 33-40). Há nenhuma ou discreta predileção pelo sexo feminino (16, 24-29).

Na Tunísia, a prevalência de PH parece ser maior, com peculiaridades epidemiológicas (27, 30). Em 1993, Morini *et al.* descreveram quadro compatível com PH em sete de 20 casos (35%) de PF. A casuística era mais jovem (média de idade de 28 anos), e composta apenas por mulheres (27). Trinta e um anos depois, Jerbi *et al.* estudaram a mesma população e encontraram 24 casos de PH com características epidemiológicas semelhantes – mulheres jovens com PF, e média de idade de 36 anos (30).

Alguns autores consideram o PH como uma variante clínica das formas clássicas de pênfigo (16), outros sugerem que seja uma entidade distinta, em virtude de sua apresentação e curso peculiares (41).

Quadro 1: Séries de casos publicadas de pênfigo herpetiforme

AUTOR / ANO	PAÍS	N	IDADE (média) Anos	GÊNERO F/M	PRURIDO N (%)	LESÕES MUCOSAS N (%)	EOSINOFILIA N (%)	IgE	ANATOMOPATOLÓGICO			IF +
									N	ACANTÓLISE	EE	
Ingber <i>et al.</i>, 1986	Israel	5	55-75 (61,4)	3 / 2	4 (80,0%)	0	ND	ND	5	3 (60,0%)	4 (80%)	SIM
Maciejowska <i>et al.</i>, 1987	Polônia	15	31-80 (60,1)	7 / 8	5 (33,3%)	4 (26,6%) Oral	ND	ND	8	1 (12,5%)	3 (37,5%)	SIM
Morini <i>et al.</i>, 1993	Tunísia	7	21-37 (28,1)	7 / 0	7 (100,0%)	0	ND	ND	7	ND	7 (100,0%)	SIM
Santi <i>et al.</i>, 1996	Brasil	7	33-74 (54,7)	4 / 3	7 (100,0%)	1 (14,3%)	ND	ND	7	2 (28,5%)	7 (100,0%)	SIM
Durdu <i>et al.</i>, 2014	Turquia	6	20-69 (45)	3 / 3	ND	ND	ND	ND	0	5 (83,3%) *	6 (100,0%) **	SIM
Laws <i>et al.</i>, 2015	Canadá	8	34-67 (53,4)	4 / 4	8 (100,0%)	0	3 (37,5%)	ND	8	4 (50,0%)	8 (100,0%)	SIM
Jerbi <i>et al.</i>, 2018	Tunísia	24	20-63 (36)	24 / 0	22 (91,6%)	0	5 (20,8%)	ND	24	10 (41,6%)	9 (37,5%)	SIM
Costa <i>et al.</i>, 2019	EUA	3	49-86 (68)	3 / 0	3 (100,0%)	0	ND	ND	3	2 (66,6%)	3 (100,0%)	SIM
Total		75	20-86 (47,3)	55/20	56/69 (81,1%)	5/69 (7,24%)	8/32 (25,0%)	ND	62	22 (35,5%)	47 (75,8%)	100%

EE: espongiose eosinofílica; F: feminino; IF+: confirmação por imunofluorescência positiva com padrão de pênfigo; IgE: imunoglobulina E; M: masculino; N = número de casos; ND: não descrito; * células acantolíticas no exame citológico; ** eosinófilos no exame citológico.

3.1.2 Aspectos clínicos do PH

Os achados clínicos do PH lembram os da DH ou do penfigóide bolhoso (PB) e incluem pápulas ou placas eritematosas urticadas de configuração anular ou circinada, e/ou vesico-bolhas agrupadas de distribuição herpetiforme (16, 26), como mostra a Figura 1. Em quase 90% dos casos, os dois padrões clínicos estão presentes simultaneamente, e as vesículas agrupadas distribuem-se preferencialmente na periferia das placas urticadas (29) (Figura 2). Lesões de aspecto eczematoso podem coexistir em poucos casos, incluindo os subtipos numular, disidrótico e asteatósico. (28). Erosões foram descritas em apenas 15% dos pacientes, possivelmente secundárias a escoriações das vesículas (29).

Figura 1: Quadro clínico do pênfigo herpetiforme. Placas eritematoedematosas anulares policíclicas no tronco (A) e antebraços (B e C)

Figura 2: Quadro clínico do pênfigo herpetiforme. Vesículas agrupadas em distribuição arciforme na periferia de placas eritematoedematosas

Prurido intenso é característico e está presente na quase totalidade dos casos de PH (30). Tronco e extremidades proximais são os locais preferencialmente acometidos, mas as lesões de PH também foram relatadas na face, região cervical e couro cabeludo (30). O comprometimento de mucosas é raro, e quando ocorre, possui predileção pela mucosa oral (16, 32). Eosinofilia no sangue periférico é achado comum, descrito em 15 a 31% dos pacientes (11, 26, 30, 42), e até o momento não há registro na literatura de aumento de IgE sérica.

O quadro de PH pode preceder, ser concomitante, ou surgir após o curso das formas mais comuns de pênfigo (PF ou PV), principalmente durante as recidivas bolhosas (16) (Figuras 3 e 4). Nem sempre é possível identificar características de PF ou PV nos pacientes, podendo o PH ocorrer como uma apresentação clínica isolada (24).

Os principais diagnósticos diferenciais clínicos do PH são DH, PB, dermatose bolhosa por IgA linear, pênfigo por IgA, PF e PV (41), além das diversas dermatoses eczematosas (28).

Figura 3: Pênfigo herpetiforme manifestando-se no curso de um pênfigo foliáceo. Primeira recidiva bolhosa como variante herpetiforme em um paciente com pênfigo foliáceo: placas urticariformes pruriginosas nos membros inferiores (A), dorso (B) e abdome (C). No detalhe, lesão característica com vesículas agrupadas no flanco esquerdo (D). Segunda recidiva bolhosa herpetiforme no mesmo paciente, evidenciando grandes placas urticariformes anulares nos antebraços (E), região sacral (F) e coxas (G)

Figura 4: Pênfigo herpetiforme manifestando-se no curso de um pênfigo vulgar. Múltiplas placas eritematoedematosas erodidas nas regiões lombossacra e glútea (A) com escoriações e vesículas (B), e acometimento da mucosa oral (C)

3.1.3 Aspectos diagnósticos do PH

Por se tratar de doença rara e apresentar semelhanças clínicas com outras dermatoses, em especial com outras dermatoses bolhosas autoimunes (DBAI), o diagnóstico de PH requer alto índice de suspeição. A investigação complementar é a base do diagnóstico, e se faz por análise histopatológica da lesão cutânea suspeita, e provas imunológicas, como a IF.

3.1.3.1 Histopatologia do PH

A biópsia de pele para análise AP deve ser feita em área com lesão suspeita de PH, preferencialmente na borda de uma placa urticariforme ou em vesícula íntegra (4).

O marco histológico do PH é a EE, ou a visualização de vesículas e bolhas intraepidérmicas contendo eosinófilos, que pode estar associada ou não a acantólise (29, 43) (Figura 5). Apesar de frequente, EE é aspecto inespecífico, e pode

ser encontrada nas outras formas de pênfigo, no grupo dos penfigóides e nas dermatoses eczematosas (44). O infiltrado eosinofílico intraepidérmico é caracteristicamente intenso, e neutrófilos também são visualizados em cerca de 30% dos casos. Em contraste com as formas clássicas de pênfigo, a acantólise está ausente ou é leve no PH, o que por vezes dificulta seu diagnóstico (29).

Por estar invariavelmente presente e aparecer isoladamente em muitos casos, EE é a principal pista histopatológica para o diagnóstico de PH em pacientes com quadro clínico sugestivo, e indica a necessidade de pesquisar depósitos imunes intercelulares intraepidérmicos por IF (44).

Figura 5: Aspectos histopatológicos do pêfigo herpetiforme. A: Espongiose eosinofílica isolada (setas pretas = eosinófilos) – x400; B: Espongiose eosinofílica com focos de acantólise intraespínhosa – x200; C: no detalhe, acantólise intraespínhosa, com eosinófilos (setas pretas) e raras células acantolíticas (setas vermelhas) – x400; D: Espongiose eosinofílica com acantólise suprabasal, e eosinófilos na derme – x200; E: no detalhe, eosinófilos (setas pretas) e células acantolíticas (setas vermelhas) – x400. (Hematoxilina-eosina)

3.1.3.2 Aspectos imunológicos

Dada a variedade de achados histopatológicos e a baixa frequência de acantólise, a demonstração de autoanticorpos antiepiteliais através dos testes de IF é fundamental para a confirmação diagnóstica. A IF possui alta sensibilidade e especificidade diagnóstica para o grupo dos pênfigos (3). A IF direta (IFD) detecta anticorpos depositados na pele perilesional dos indivíduos acometidos, enquanto a IFI pesquisa autoanticorpos circulantes no soro (45).

No PH, os achados são semelhantes aos das formas clássicas de pênfigo. A IFD demonstra depósitos intercelulares intraepidérmicos de imunoglobulina G (IgG) em 100% dos casos, e de complemento 3 (C3) em cerca de 60% (26) (Figura 6). O depósito de C3 concomitante varia conforme a subclasse de IgG, uma vez que IgG1 e IgG3 possuem maior afinidade pelo complemento. Pode-se visualizar depósito de imunoglobulina A (IgA) em raros casos (46). A IFI é positiva em 80% dos casos, preferencialmente para IgG contra os antígenos epidérmicos (29).

Em relação às subclasses de IgG circulantes e na pele dos pacientes com PH, IgG1 e IgG4 são predominantes, mas seu papel patogênico não foi comprovado (47, 48). Postula-se que a lesão tecidual no PH requer recrutamento de eosinófilos e neutrófilos via porção Fc da IgG, o que só acontece com as subclasses IgG1 e/ou IgG3 (47). É incerto se no PH os autoanticorpos da classe IgG4 teriam papel patogênico como nos pênfigos clássicos, causando acantólise por mecanismo direto (49).

Figura 6: Imunofluorescência direta no pênfigo herpetiforme. Depósito de IgG (A) e C3 (B) entre os queratinócitos epidérmicos (x400)

Outros recursos auxiliares também podem identificar a presença de imunoglobulinas e de antígenos envolvidos nas DBAI e incluem a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), a imunoprecipitação e o *western blotting*. No PH, Dsg1 foi o principal antígeno alvo, e menos comumente detectou-se Dsg3 e 1, e Dsc1, Dsc2 e Dsc3 (50, 51).

O exame citológico também pode ser útil para o diagnóstico de PH ao demonstrar a presença de células acantóticas e *tadpole cells* (células epidérmicas com citoplasma em formato de cauda, características das dermatites eczematosas) (28). Apesar de ser uma ferramenta diagnóstica simples, rápida e de baixo custo, possui baixa especificidade quando realizada isoladamente. A IFD do esfregaço citológico aumenta sua acurácia diagnóstica (52).

3.1.3.3 Critérios diagnósticos

O diagnóstico de PH requer alto índice de suspeição em pacientes que apresentam eritema urticado, com ou sem vesículas de distribuição herpetiforme, num contexto de alterações histopatológicas compatíveis. A baixa especificidade destes achados, especialmente nos casos sem acantólise, e sua variação em diferentes momentos do curso clínico dificultam a definição de critérios diagnósticos precisos para o PH (29, 53). Os testes imunológicos constituem a principal ferramenta diagnóstica, visto que seus achados são específicos dos pênfigos, independente do momento evolutivo da doença, porém são pouco disponíveis e de alto custo (45, 54).

Os primeiros critérios diagnósticos para PH foram propostos por Jablonska *et al.* e compreendem a presença de EE, depósitos intercelulares intraepidérmicos de IgG, e acantólise em nível epidérmico variável (17). Desde então, outros autores sugeriram critérios semelhantes e mais amplos (29, 41), como detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Critérios diagnósticos propostos para o pênfigo herpetiforme

Critérios Diagnósticos		
Clínicos	Histopatológicos	Imunológicos
Eritema urticariforme anular, pruriginoso, com ou sem erosões;	Espongiose eosinofílica com ou sem espongiose neutrofílica, com ou sem acantólise.	IFD: IgG e/ou C3 intraepidérmico intercelular;
Vesicobolhas pruriginosas agrupadas com distribuição herpetiforme.		IFI: IgG contra superfície epitelial; Detecção de autoanticorpos circulantes contra Dsg1, Dsg3, Dsc1, Dsc2 e/ou Dsc3.

Diagnóstico de pênfigo herpetiforme requer 1 critério clínico, 1 histopatológico e 1 imunológico. C3: complemento 3; Dsc: desmocolina; Dsg: desmogleína; IFD: imunofluorescência direta; IFI: imunofluorescência indireta; IgG: imunoglobulina G. Fonte: Adaptado de Costa *et al.* (2019) (29).

3.1.4 Curso e Tratamento do PH

O manejo terapêutico dos pênfigos clássicos baseia-se primordialmente no uso de corticosteróides sistêmicos associados ou não a drogas imunossupressoras diversas, entre elas a azatioprina, o micofenolato de mofetila e a ciclofosfamida (55). Dapsone (DDS) pode ser indicada nos quadros leves e refratários do PV e PF, e nas lesões mucosas resistentes do PV como medicação adjuvante à corticoterapia sistêmica (56). Cloroquina é eficaz para as lesões em áreas fotoexpostas (57). Casos mais graves podem ser tratados com imunoglobulina endovenosa e plasmaférese (55). O uso de agentes biológicos (rituximabe ou anti-CD20) tem sido relatado nas formas mais graves de pênfigo e refratárias a outros tratamentos (58, 59).

No que se refere especificamente ao PH, a escolha terapêutica pode ser desafiadora. A casuística mundial é pequena e os dados na literatura são insuficientes para fornecer boas evidências científicas a respeito do seu manejo terapêutico.

Acredita-se que o PH apresente curso mais benigno e de melhor prognóstico em relação aos pênfigos clássicos (41). Muitos casos respondem bem à monoterapia com DDS, considerada droga de primeira escolha por muitos autores (26, 41). Outros relatos divergem e mostram melhor resposta à corticoterapia sistêmica isolada, ou à combinação de ambas as drogas (16, 24). Na maior coorte já publicada de PH, Jerbi *et al.* observaram que as 24 pacientes com PH seguidas a longo prazo na Tunísia não responderam à DDS isoladamente, com necessidade de associar corticosteroides sistêmicos em todos os casos (30). O índice de remissão, mesmo após a associação do corticosteroide sistêmico, foi de 64% (30).

Nos casos resistentes, a combinação de drogas imunossupressoras pode ser necessária. Tratamentos diversos foram descritos com respostas variáveis nos casos de PH, e incluem: azatioprina (24, 26, 60), sulfapiridina (61), ciclofosfamida (24, 62), micofenolato de mofetila (63), micofenolato sódico (64), metotrexato (27, 34), leflunomida(26), imunoglobulina intravenosa (26, 65) e plasmáfêse (24, 65). Laws *et al.* relataram dois pacientes com PH sem resposta satisfatória ao rituximabe (26).

Os mecanismos que promovem formação de lesões e o processo de reparação tecidual dos doentes com PH permanecem desconhecidos. O melhor entendimento desses fatores provavelmente contribuirá para a proposição de abordagens terapêuticas específicas, com ênfase no controle de mediadores inflamatórios próprios e na redução da síntese de autoanticorpos.

3.1.5 Etiopatogenia do PH

A formação das lesões cutâneas e mucosas nos pênfigos decorre do ataque autoimune a estruturas de adesão intercelular, que culminam em acantólise – clivagem intraepitelial própria deste grupo de doenças (4).

Os desmossomas (Figura 7), presentes entre os queratinócitos da epiderme, são os principais alvos dos autoanticorpos nos pênfigos, mais especificamente duas glicoproteínas da sua porção transmembranosa: Dsg1 e Dsg3 (66). A perda de adesão intercelular e consequente acantólise traduz-se clinicamente pela formação de vesículas e bolhas. As células acantolíticas podem ser detectadas ao exame AP e correspondem aos queratinócitos que perdem a adesão intercelular e assumem formato arredondado com aspecto atípico (67). A acantólise é mediada tanto por mecanismos extracelulares, nos quais a interação entre a IgG e a Dsg bloqueia a ligação Dsg-Dsg responsável pela adesão intercelular, como por mecanismos intracelulares dependentes de sinalização (68, 69). O subtipo IgG4 foi detectado como a subclasse patogênica de IgG nos pênfigos, pois é capaz de ativar diretamente as vias de sinalização intracelular indutoras de acantólise (70, 71).

Segundo a teoria da compensação, a molécula-alvo dos autoanticorpos e sua distribuição na pele determinam o nível de clivagem e o fenótipo específico de cada subtipo de pênfigo (72).

No PF, a acantólise ocorre a nível subcórneo e o comprometimento é exclusivamente cutâneo devido à produção de anticorpos contra a Dsg1, que possui localização preferencial nas camadas superiores da epiderme (73). A ausência de lesões mucosas no PF é explicada pela expressão preferencial de Dsg3 nessa região, que compensa a perda de Dsg1 e permite a manutenção da sua integridade (74).

O PV, por sua vez, caracteriza-se por acantólise na camada suprabasal induzida pelos anticorpos contra a Dsg3, dada sua distribuição preferencial nas porções inferiores da

epiderme. O processo é provocado exclusivamente por anticorpos anti-Dsg3 na variante mucosa isolada, e com produção concomitante de anti-Dsg1 na variante mucocutânea (5).

No PH, o perfil de autoanticorpos específicos foi avaliado por poucos autores, que sugerem predominância de anti-Dsg1, e menos frequentemente de anti-Dsg3 (75) e anti-Dsc1 e Dsc3, outro grupo de proteínas presentes na porção transmembranosa dos desmossomas (42, 65, 76, 77).

Fonte: adaptado de *Dermatology*, 2012, 3ª edição (78)

Figura 7: Desmossoma. DP: desmoplaquina; Dsc: desmocolina; Dsg: desmogleína; PG: placoglobina; PP: placofilina

Apesar de alguns antígenos-alvo já terem sido identificados e serem comuns àqueles dos pênfigos clássicos, não há explicação clara para o mecanismo pelo qual os autoanticorpos produzem as lesões cutâneas peculiares do PH. A menor frequência ou ausência de acantólise com intensa inflamação, menor frequência de acometimento mucoso, inclusive em pacientes com anticorpos anti-Dsg3 (que são tipicamente

associados a lesões mucosas no PV), assim como o fenótipo clínico singular com prurido característico, inferem a existência de mecanismos fisiopatológicos e mediadores inflamatórios específicos que sejam responsáveis pelo fenótipo e aspectos distintos do PH (41, 47, 79).

Uma das hipóteses aventadas considera que no PH os autoanticorpos reconheçam epítomos funcionalmente diferentes dos antígenos envolvidos, e provavelmente menos patogênicos, o que acarretaria em resposta diversa à dos pênfigos clássicos, não resultando necessariamente em acantólise (47, 80). Propõe-se também que vias de sinalização induzidas pelos autoanticorpos levariam à produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias específicas do PH. O'Toole *et al.* reforçam essa teoria ao demonstrar aumento da produção de IL-8 em cultura de queratinócitos dos pacientes com PH, quando comparados a pacientes sadios ou portadores de PV (48). O aumento de IL-8 induziria o recrutamento de eosinófilos e neutrófilos para a pele lesada via porção Fc da IgG patogênica (especificamente IgG1 e IgG3), a exemplo do que acontece no PB e na epidermólise bolhosa adquirida (81, 82). Secundariamente, a liberação de proteases e outros mediadores químicos das células efetoras resultaria em edema intercelular focal e EE ou neutrofílica, com pouca ou nenhuma acantólise (48).

Identificou-se, ainda, que os autoanticorpos no PH são capazes de reconhecer igualmente todos os domínios extracelulares da Dsg3, enquanto no PV o reconhecimento é substancialmente maior na porção N-terminal do domínio extracelular 1 (EC1) (80) - (Figura 8). No entanto, esta diferença nos sítios antigênicos e no perfil da subclasse de IgG não é suficiente para explicar a ausência de lesões mucosas em muitos pacientes com PH e anti-Dsg3, visto que o perfil imunológico se mantém durante a evolução desses pacientes independente da mudança de padrão fenotípico ao longo do tempo (47).

Fonte: adaptado de Gumbiner *et al.*, 2005 (83)

Figura 8: Estrutura e epítopos das desmogleínas. EC: domínios extracelulares 1 a 5; Dsg: desmogleína

A reatividade contra a Dsc1 e Dsc3 é outro fator que poderia exercer papel patogênico no PH (41). As Dsc são um grupo de proteínas transmembranosas da família das caderinas, e já foi demonstrado que são cruciais para a adesão entre os queratinócitos, em especial a Dsc3 (84, 85). A identificação de anticorpos anti-Dsc1 e 3 no soro de pacientes com PH pode, portanto, não se tratar apenas de um epifenômeno (41).

Mais recentemente, Ishiura *et al.* (86) utilizaram microscopia eletrônica de transmissão (MET) na pele de um paciente com diagnóstico confirmado de PH, e evidenciaram formação de múltiplos vacúolos dentro dos queratinócitos, gerando ruptura das membranas celulares, sem perda de adesão desmossomal. Estes achados explicariam a EE sem acantólise no AP do paciente. Ainda, observou-se depósito de IgG tanto na superfície dos queratinócitos, quanto nas paredes internas dos vacúolos, ao redor dos núcleos dos queratinócitos, e na superfície dos eosinófilos intraepidérmicos. O único antígeno detectado foi uma proteína intracelular da porção não desmossomal da Dsg1, por *immunoblotting*. Com estes resultados, associados aos níveis séricos aumentados de TARC (*Thymus and activation-regulated chemokine*) e IL-5, os autores sugeriram o papel de antígenos não desmossomais da Dsg e de citocinas da resposta Th2 (T helper 2) - especialmente TARC e IL-5, na indução da resposta inflamatória no PH (86).

As evidências parciais descritas acima reforçam a possível influência de fatores imunopatogênicos presumíveis, tais como ativação Fc-dependente de granulócitos por autoanticorpos com baixo poder acantolítico, autorreatividade contra antígenos adicionais, ou outros mecanismos ainda desconhecidos, como determinantes para o fenótipo peculiar do PH, e ainda, uma possível participação da resposta imune adaptativa cutânea.

3.2 Resposta imune adaptativa cutânea

As doenças cutâneas imunomediadas podem ser predominantemente induzidas por células T, pelo sistema imune humoral, ou por processos inflamatórios inespecíficos (87). A imunidade adaptativa consiste em resposta imune composta pelos linfócitos e por seus produtos moleculares (citocinas e anticorpos), com elevada especificidade antigênica, e está envolvida no controle de infecções e na fisiopatogenia de vários processos inflamatórios da pele (88, 89). Baseado nos perfis de síntese de citocinas, a população de células T CD4 efetoras e de memória é subdividida em conjuntos funcionalmente distintos (90, 91). As células *Th1* produzem IL-12 e IFN γ (interferon gama) e induzem resposta imune celular para o combate a infecções virais e patógenos intracelulares (92, 93). Já as células *Th2* produzem IL-4, IL5 e IL-13, indutoras da síntese de IgE e eosinofilia, e envolvidas na patogênese das doenças atópicas e na defesa contra parasitas extracelulares(91, 94) (Figura 9).

Nos últimos anos, o espectro de subpopulações de células T expandiu-se com a identificação de novos padrões de resposta: *Th17* (produtora de IL-17 e IFN γ , importante na defesa epitelial antimicrobiana, além do recrutamento e ativação de neutrófilos) (95), *Th22* (produtora de IL-22, indutora de reparação tecidual) (96), *Th9* (produtora de IL-9,

importante na defesa contra helmintos intestinais e exacerbação dos mecanismos alérgicos) (97, 98), *Tfh* (*T follicular helper*) - atua na formação dos centros germinativos (99), e *Treg* (*T regulatória*) - induz tolerância imune (100) – Figura 9.

Fonte: Adaptado de Sabat et al., 2019 (87).

Figura 9: Fenótipos e funções das subpopulações de células T CD4⁺. Ag: antígeno; APC: célula apresentadora de antígeno; IL: interleucina; INF γ : interferon gama; Ly: linfócito; TGF- β : *transforming growth factor beta* ; *Tfh*: *T follicular helper*, *Th*: células *T helper*, TNF α : *tumor necrosis factor alpha*; *Treg* *T regulatória*

A dermatite atópica (DA) é tida como doença-modelo de resposta bifásica *Th1/Th2*, e mais recentemente os fenótipos celulares *Th9*, *Th17* e *Th22* também se mostraram envolvidos (101). Há predomínio da expressão de citocinas *Th2* e *Th22* na fase aguda da DA, enquanto o eixo *Th1* é característico da sua fase crônica (102-104).

Na DA, as citocinas do fenótipo *Th2* são produzidas por células T de memória que possuem o receptor CLA (*cutaneous lymphocyte associated antigen*) e induzem a síntese de IgE e de IL-5, que desempenha um papel importante no desenvolvimento de eosinófilos (94, 105). Por outro lado, estes linfócitos produzem níveis baixos de IFN γ , uma citocina *Th1* que inibe a função das células *Th2* (94, 105).

A IL-31 é outra citocina que tem obtido relevância crescente nos últimos anos, principalmente por estar associada à inflamação crônica e à indução e manutenção do prurido nesses pacientes (106), e tem sido cogitada como um potencial alvo terapêutico para o prurido refratário na DA (107).

3.2.1 Interleucina-31

As citocinas da resposta *Th2* classicamente correlacionam-se com o desenvolvimento imunológico de diversas desordens alérgicas. Porém, de forma similar ao PH, outras doenças cutâneas associadas a intenso prurido possuem mecanismos fisiopatológicos complexos e incompletamente elucidados. Há evidências crescentes de que a IL-31, citocina recentemente descoberta, possa desempenhar papel importante em dermatoses inflamatórias crônicas e no desencadeamento do prurido (108-112).

3.2.1.1 Interleucina-31: biologia molecular e funções

A IL-31 é membro da família da IL-6 e seu mecanismo de ação envolve a ativação de receptor heterodimérico composto por duas subunidades: IL-31RA e OSMR (*oncostatin M receptor beta*) (113). Sua ativação induz algumas vias de sinalização, incluindo a Jak-STAT (*janus kinase/ signal transducer and activator transcription*), AKT/PI3K (*protein kinase B / phosphoinositide 3-kinase*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (113, 114).

A expressão da IL-31 foi identificada em diversos tecidos humanos, com predominância nos linfócitos T CD4+ ativados. É secretada predominantemente por linfócitos *Th2*, mas também por eosinófilos, células dendríticas e macrófagos (115).

Nos queratinócitos, a atividade de IL-31 é mais proeminente via fosforilação de STAT3 e ativação da subunidade IL-31RA, que é o receptor com maior importância nos processos cutâneos (114). Além dos queratinócitos, o IL-31RA é expresso nos eosinófilos e nas terminações nervosas sensoriais cutâneas (114).

Dentre as várias funções da IL-31, destacam-se a indução do prurido e a promoção da inflamação mediada por células *Th2*. A IL-31 induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos, macrófagos e queratinócitos, assim como de citocinas *Th2* pelos basófilos, incluindo IL-4 e a própria IL-31 (116), mas os mecanismos exatos ainda são pouco compreendidos (110, 117). O estímulo pruritogênico decorre da ligação da IL-31 ao IL31RA nas terminações nervosas sensoriais cutâneas (118, 119). Além disso, a IL-31 parece afetar a diferenciação dos queratinócitos epidérmicos e leva a prejuízos físicos e funcionais da barreira cutânea (120, 121).

Há evidências de que o IFN γ promove aumento da expressão de IL31-RA nos queratinócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (120, 122, 123), e a própria IL-31 induz o mesmo efeito nos gânglios das raízes dorsais (124). Edukulla *et al.* evidenciaram que a IL-4 e IL-13 foram capazes de induzir o aumento da expressão do receptor IL-31RA nos macrófagos peritoneais e derivados de medula óssea de murinos (125). Estudos adicionais indicaram que os níveis séricos de IL-31 correlacionaram-se significativamente com os de IL-4 e IL-13 em crianças com DA (126), sugerindo um importante papel modulador entre citocinas *Th2* e sinalização de IL-31 nas doenças alérgicas.

3.2.1.2 Interleucina-31 e pele

Estudos em animais demonstraram que a IL-31 induziu prurido e dermatite em camundongos, assim como sua neutralização com anticorpos específicos resultou na atenuação de comportamentos compensatórios para alívio do prurido (111, 120). Altos níveis séricos de IL-31 e/ou sua expressão cutânea aumentada foram descritos na DA, dermatite de contato alérgica, urticária crônica espontânea, prurigo nodular, linfoma cutâneo primário e mastocitose, sendo que em algumas desordens houve correlação entre seus níveis e a gravidade do quadro (111, 117, 127-132). A IL-31 também tem importância em patologias extracutâneas, tais como asma brônquica, rinite alérgica, doença inflamatória intestinal, osteoporose e doenças mieloproliferativas (108, 133-135).

A maioria dos estudos abordam IL-31 no contexto da DA, e o aumento dos seus níveis séricos correlacionou-se positivamente com a intensidade do prurido nesses pacientes (110, 111). Porém, os autores divergem ao demonstrar correlação entre IL-31 e a gravidade da DA ou os níveis séricos de IgE (117, 126, 136, 137).

O bloqueio da IL-31 tem sido investigado no tratamento da DA (138). Nemolizumabe (CIM331) é um anticorpo monoclonal humanizado anti-IL-31RA que bloqueia a sinalização mediada pela IL-31. Em ensaio clínico em fase II, o nemolizumabe mostrou-se eficaz em reduzir prurido e gravidade da dermatite, e melhorar a qualidade do sono em pacientes com DA moderada a grave inadequadamente controlados com corticosteroides tópicos (139, 140). Um anticorpo monoclonal anti-IL31 (BMS-981164) também foi desenvolvido, e o ensaio clínico, cujos resultados ainda não foram publicados, encontra-se em fase I (114).

No que concerne às DBAI, Bonciani *et al.* foram os primeiros a demonstrar aumento da expressão de IL-31 tanto no soro quanto na pele de pacientes com DH e com PB (141). Posteriormente, Rüdrieh *et al.* constataram aumento nas concentrações de IL-31 no fluido das bolhas de pacientes com PB através do método de ELISA (142).

Observaram ainda, maior expressão de IL-31 nos eosinófilos cutâneos, e maior liberação pelos eosinófilos séricos nesses pacientes quando comparados a controles saudáveis, o que os levou a considerar que os eosinófilos são a principal fonte celular produtora de IL-31 no PB (142). No PH, a expressão da IL-31 não foi estudada.

Os dados apresentados corroboram com a hipótese de que a IL-31 desempenhe papel importante na patogenia das desordens alérgicas *Th2* mediadas e na indução do prurido. Apesar de sua expressão aumentada ter sido demonstrada em algumas doenças cutâneas, inclusive DBAI, nenhum estudo abordou o seu papel no PH, e não há evidências que determinem os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa variante clínica.

Os autores consideram de relevância o estudo do perfil de expressão de proteínas tais como IL-31 e seu receptor IL-31RA, assim como outras interleucinas da resposta imune adaptativa, possivelmente envolvidas no prurido e apresentação clínica peculiar do PH. A elucidação de aspectos ainda inéditos da etiopatogenia do PH poderá contribuir para a descoberta de novos alvos terapêuticos que possibilitem tratamentos eficazes e mais seguros, com menor índice de efeitos adversos em relação aos disponíveis atualmente.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Critérios de inclusão

O presente estudo foi comparativo observacional, retrospectivo/prospectivo e longitudinal. Os participantes com PH, PF e PV foram selecionados no ambulatório de DBAI do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), por meio de revisão de prontuários e das consultas clínicas de acompanhamento.

Todos os pacientes com hipótese diagnóstica de PH entre 2008 e 2018 foram analisados, e foram incluídos aqueles com exame clínico compatível e que apresentavam os dois critérios diagnósticos a seguir: 1 - presença de EE no exame histopatológico; e 2- depósito intraepidérmico de IgG visualizado na IFD e/ou anticorpos circulantes na IFI, ambos com padrão intercelular, em amostras de pele ou soro armazenados.

Os resultados foram comparados aos de pacientes com o diagnóstico de PV e PF, observando-se os seguintes critérios: presença de doença ativa, fragmento de pele previamente obtido e compatível com o diagnóstico histológico da doença.

Os CS foram selecionados a partir de doadores de fragmentos de pele normal, cujas amostras de pele utilizadas foram advindas de mamoplastias ou abdominoplastias realizadas no Departamento de Cirurgia Plástica do HCFMUSP, e encontravam-se no Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, e

no Laboratório do Instituto de Medicina Tropical – Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56).

Por se tratar de análise em material humano previamente armazenado, foi mantido sigilo dos doentes, de acordo com a declaração de confidencialidade aprovada pelo Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (parecer de número 1.633.103).

4.1.2 Critérios de exclusão

Excluíram-se os doentes que não apresentavam confirmação diagnóstica de PH, PF ou PV conforme os critérios acima, e aqueles que não possuíam material biológico armazenado nos laboratórios do HCFMUSP.

4.2 Avaliação demográfica e laboratorial

- Coleta dos dados clínicos e demográficos dos pacientes com PH, PF e PV

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos através da análise dos prontuários dos pacientes, e complementados durante suas consultas de seguimento no ambulatório de DBAI do HCFMUSP.

- Avaliação dos níveis séricos de IgE e eosinófilos dos pacientes com PH, PF e PV

A dosagem sérica de IgE foi realizada na DLC (Divisão de Laboratório Central) - FMUSP. Foram considerados níveis normais aqueles até 100 UI/mL.

A contagem de eosinófilos no sangue periférico foi aferida na DLC - FMUSP, com valores de referência de normalidade de 50 a 500 por mm³.

Foram considerados para o estudo apenas os níveis sérios de IgE e eosinófilos coletados no período de 6 meses antes até 6 meses após a confirmação diagnóstica de PH pelos testes imuno e histopatológicos, e aqueles coletados durante a fase ativa da doença nos pacientes de PF ou PV. Os resultados analisados originaram-se do banco de exames informatizados da DLC do HCFMUSP.

4.3 Avaliação do prurido nos pacientes com PH, PF e PV

O prurido foi avaliado por meio da aplicação de escala analógica visual de prurido (VAS) (143), conforme demonstrado na figura 10. Esta escala foi explicada aos pacientes durante suas consultas de seguimento no ambulatório de DBAI do HCFMUSP, e os mesmos atribuíam uma nota de 0 a 10 ao seu prurido.

Fonte: Adaptado de Reich *et al.*, 2012 (143)

Figura 10: Ilustração da escala analógica visual utilizada para avaliar a intensidade referida do prurido nos pacientes com pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar

4.4 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica das amostras de pele foi realizada através da coloração de hematoxilina-eosina (HE), utilizando-se fragmentos previamente fixados em formol e embebidos em parafina dos indivíduos com PH, PF, PV e dos CS.

Foram levantados os cortes histológicos de 36 pacientes com hipótese diagnóstica PH - dos quais 25 se enquadraram aos critérios de inclusão, 14 pacientes com PF, 15 pacientes com PV e 10 CS.

Para análise da presença, localização e grau de acantólise dos pacientes com PH, todas as lâminas foram revisadas por um dermatologista e por um dermatopatologista com experiência em DBAI.

Todos os fragmentos de pele foram submetidos às técnicas de imuno-histoquímica (IH), incluindo aqueles adicionais de 4 pacientes com PH que apresentavam espécimes colhidos em diferentes fases da doença: na fase inicial cujo diagnóstico era de pênfigo foliáceo, e no estágio de evolução para a variante herpetiforme.

4.5 Técnica de imuno-histoquímica

Para a demonstração da expressão de IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-17, e TNF α nos espécimes de pacientes com PH e nos grupos controle foi utilizada a técnica de IH. Todos os anticorpos utilizados têm padrão de marcação predominantemente citoplasmático, com exceção do IL-31RA, que tem expressão predominantemente membranosa.

Cortes histológicos de quatro μ m de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA*,

cód. A3648) a 2%. A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, em temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavagem em água corrente por cinco minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em banho maria a 95°C. As lâminas foram colocadas na solução *Target Retrieval Solution* pH 9,0 (cód. S2367, *DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA*) ou na solução *Target Retrieval Solution* (cód. S1699, *DakoCytomation*) dependendo do anticorpo utilizado (**Quadro 2**).

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 2) diluídos em BSA fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7.4, “*over-night*” a 4°C.

Quadro 2: Relação e especificações dos anticorpos primários utilizados na avaliação dos espécimes de pele de pacientes de pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e nas peles sãs

Anticorpo	Diluição	Código	Marca	Recuperação Antigênica	Sistema de Detecção	Controle positivo
IL-4	1:10	AF-204-NA	R&D Systems	Banho Maria 95°C 20' (S2367)	N-Histofine	Pele
IL-17	1:20	AF-317-NA	R&D Systems	Banho Maria 95°C 20' (S2367)	LSAB	Tonsila
IL-31	1:80	Ab102750	Abcam	Banho Maria 95°C 20' (S1699)	Novolink	Pulmão
IL-31RA	1:60	AF-2769	R&D Systems	Banho Maria 95°C 25' (S1699)	LSAB	Pulmão
TNF α	1:500	Ab9635	Abcam	Banho Maria 95°C 20' (S1699)	Novolink	Amígdala

IL-4: interleucina-4; IL-17: interleucina-17; IL-31: interleucina-31; IL-31RA: IL-31 *receptor alpha*; TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário (*Novolink Max Polymer Detection System*, cód. K0690, *Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK*), em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente. De maneira semelhante, as lâminas em que foi usado o sistema LSAB (cód. K0690, *Dakocytomation*) foram incubadas com o link biotilado por 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero (*Novolink Max Polymer Detection System*, cód. RE7280-K, *Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK*), em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente. As demais lâminas foram incubadas com a *streptavidina-HRP* do sistema LSAB, por 30 minutos a 37°C.

Para a identificação de IL-4 foi utilizado outro sistema de visualização, chamado *N-Histofine Simple Stain Max Polymer anti-goat* (cód. 414161F, *Nichirei Biosciences*,

Tokyo, Japan). Esse sistema é constituído de um único reagente (polímero), com o qual as lâminas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

A seguir, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, *SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA*, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos, e posteriormente foram lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina *Permout* (*FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA*, cód. SP15-100).

As reações IH foram realizadas no Laboratório do Instituto de Medicina Tropical - LIM 56, do Departamento de Dermatologia da FMUSP, sob a supervisão da Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto.

4.6 Análise de imagem e quantificação das marcações IH

Após coradas, as lâminas foram escaneadas utilizando-se o escâner de lâminas *Pannoramic Scan – 3Dhistech* (*3DHistech Ltd., Budapest, Hungary*). As lâminas digitalizadas foram exportadas em formato *.TIFF* e convertidas para *.JPG* com máxima qualidade, e posteriormente submetidas a análise quantitativa da expressão dos marcadores em estudo e medida do comprimento da membrana basal da epiderme acometida. Para as análises de imagem foi utilizado o programa *Image-Pro Plus*, versão 4.5.0.29 para Windows (*Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA*) (29). Para cada espécime, foram avaliadas duas regiões individualmente: epiderme e derme superficial, esta última caracterizada pela área de derme imediatamente abaixo da

membrana basal e constituída por tecido conjuntivo mais frouxo, com profundidade aproximada de 500 μ m abaixo das cristas epidérmicas.

A expressão no citoplasma e membranas celulares de IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-17 e TNF α na epiderme e derme superficial foi calculada determinando-se a área de interesse no software e identificação das áreas positivamente marcadas, através de um espectro de cor pré-definido por um patologista com experiência neste tipo de análise e aplicado a todas as imagens. Em cada área de interesse foi obtida a área positiva e a densidade ótica integrada (IOD - *Integrated Optic Density*) - produto da densidade de cor (DMC) pela área positiva (em μm^2). Dividimos o IOD pela área positiva para obter a DMC, que varia numa escala de 0 a 255 (na qual 0 corresponde ao preto e 255 ao branco). Posteriormente, afim de distribuir área e cor em uma mesma escala, obtivemos os resultados inversos da DMC multiplicada pela área positiva. A expressão dos marcadores medidos na derme superficial foram normalizados pela área total e expressos como porcentagem de área marcada em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. As marcações da epiderme foram normalizadas tanto pela área total ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$) quanto pelo comprimido da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). Como ambos os resultados estatísticos foram semelhantes para todos os marcadores, o parâmetro escolhido para descrevermos os resultados dos marcadores epidérmicos foi a porcentagem de área marcada, em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. Esses índices de expressão levam em consideração a intensidade da cor e a área corada.

4.7 Fluxograma do estudo

AP: anatomopatológico; CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa; CS: controles com pele sã; DBAI: dermatoses bolhosas autoimunes; HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; HD: hipótese diagnóstica; IF: imunofluorescência; IgE: imunoglobulina E; INF γ : interferon gama; IL-4: interleucina-4; IL-17: interleucina-17; IL-31: interleucina-31; IL-31RA: IL-31 receptor α ; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*.

4.8 Análise estatística

Os dados foram armazenados e organizados no software *Excel® for Windows*.

Foram calculados a média e o desvio-padrão das variáveis demográficas, da escala VAS de avaliação do prurido, dos níveis séricos de eosinófilos e de IgE.

Os dados categóricos foram descritos pela sua frequência de ocorrência e pela sua respectiva proporção (%). Quando submetidos à inferência na comparação de grupos, foram utilizados os testes qui-quadrado.

Para analisar a semelhança entre os grupos para sexo e idade, utilizamos o qui-quadrado e o teste T não paramétrico, respectivamente.

A comparação da população de células imunomarcadas para IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-17, e $\text{TNF } \alpha$ nos grupos avaliados (PH, PF, PV e CS) foi realizada através de teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para análise da correlação entre variáveis contínuas, foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa “*GraphPadPrism*” versão 8.0 para *Mac* (*GraphPad software*, San Diego, CA, USA). O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise das variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais

Os 36 prontuários e os resultados dos exames imuno e histopatológicos de todos os pacientes com diagnóstico de PH acompanhados no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2018 no ambulatório de DBAI do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP foram revisados, e 25 (69,4%) deles se adequaram aos critérios de inclusão do estudo.

5.1.1 Dados demográficos e clínicos dos pacientes com PH

Dos 25 pacientes com PH incluídos no estudo, 19 (76%) eram do gênero feminino e 6 (24%) do gênero masculino, com idades variando entre 16 e 79 anos (média 51,28 anos). Houve predomínio de indivíduos brancos (n=23; 92% do total) em relação aos pardos (n=1; 4% do total) e aos negros (n=1; 4% do total) (Tabela 2).

Do total de 25 pacientes, o PH iniciou-se e manteve-se como diagnóstico isolado em 12% (n=3); associou-se a PF em 56% (n=14 pacientes, sendo 1 precedendo o PF, 5 com início concomitante ao PF, e 8 durante uma recidiva bolhosa); e associou-se a PV em 24% (n=6, sendo 2 de início concomitante e 4 durante a recidiva bolhosa do PV clássico). Dois pacientes (8%) evoluíram com mudança de padrão fenotípico e histopatológico de PV para PF (*epitope spreading*), e o PH desenvolveu-se simultaneamente à mudança do curso evolutivo para PF.

Tabela 2: Dados demográficos dos pacientes com pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar

	PH		PF		PV	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
IDADE	51,28	21,09	53,85	15,43	44,93	10,86
(anos)	(16-79)		(26-73)		(30-69)	
	N	%	N	%	N	%
GÊNERO	25	100,0%	14	100,0%	15	100,0%
F	19	76,0%	6	42,9%	8	53,3%
M	6	24,0%	8	57,1%	7	46,7%
COR	25	100,0%	14	100,0%	15	100,0%
BR	23	92,0%	12	85,7%	14	93,3%
NE	1	4,0%	1	7,1%	0	0,0%
PD	1	4,0%	1	7,1%	1	6,7%

BR: pele branca; DP: desvio padrão; F: feminino; M: masculino; N: número de casos; NE: pele negra; PD: pardos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar.

Clinicamente, todos os pacientes manifestaram prurido e placas eritemato-edematosas circinadas, com ou sem vesículas com distribuição herpetiforme, principalmente no abdome e membros proximais. Acometimento mucoso foi observado em 5 pacientes (20%), diagnosticados como PV. Destes, 5/5 apresentaram envolvimento oral, e 1/5 apresentou acometimento esofágico concomitante. Um dos pacientes com diagnóstico de PV (PH1, do anexo 1) não apresentou mais lesões mucosas após desencadeamento da variante herpetiforme.

Todos os pacientes necessitaram de terapia sistêmica. A droga mais utilizada foi a prednisona, e os tratamentos de cada caso encontram-se detalhados no Anexo 2. Rituximabe foi utilizado e induziu remissão completa em um paciente (PH6), refratário a prednisona sistêmica, micofenolato de mofetila, azatioprina e doxiciclina.

Para descrever a evolução e resposta ao tratamento até o final deste estudo, os pacientes com PH foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pelo consenso sobre tratamento dos pênfigos (144): (1) Controle da doença (parada no surgimento de novas lesões pelo período mínimo de 2 semanas e início da cicatrização das lesões antigas, em resposta ao início do tratamento); (2) Remissão completa sem terapia (ausência de novas lesões em indivíduo sem tratamento por pelo menos 2 meses); (3) Remissão completa com terapia (ausência de lesões, porém com paciente em terapia mínima: prednisona < 10mg/dia ou outra opção de ação sistêmica); (4) Remissão parcial sem terapia (lesões transientes em paciente sem tratamento); (5) Remissão parcial com terapia (poucas lesões em uso de terapia sistêmica); (6) Remissão parcial com terapia mínima (tratamento tópico ou < 10mg/dia de prednisona); e (7) recidiva (surgimento de 3 ou mais lesões que não desaparecem dentro de 1 semana; ou definida pela extensão de lesões já estabelecidas nos pacientes que tenham atingido controle da doença); (8) Falha ou resistência terapêutica (surgimento de novas lesões, manutenção da extensão ou não cicatrização das lesões antigas, apesar de terapia por pelo menos 3 semanas com prednisona 1,5 mg/kg/dia ou equivalente, com ou sem um dos agentes imunossupressores por 12 semanas – ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato ou micofenolato de mofetila). Segundo a tabela 3, 40% dos pacientes com PH (10/25) encontravam-se em remissão parcial com terapia, 20% (5/25) em remissão parcial com terapia mínima, 16% (4/25) resistentes ao tratamento, 12% (3/25) em remissão completa com terapia e 12% (3/25) em remissão completa sem terapia, no momento final do presente estudo.

Tabela 3: Classificação evolutiva dos pacientes com pênfigo herpetiforme no momento final do presente estudo.

CLASSIFICAÇÃO EVOLUTIVA	N	%	Δt (anos)
	25	100,0%	
1) Controle	0	0,0%	NA
2) Remissão completa sem terapia	3	12,0%	6,33 (2-9)
3) Remissão completa com terapia	3	12,0%	2 (1-3)
4) Remissão parcial sem terapia	0	0,0%	NA
5) Remissão parcial com terapia	10	40,0%	3,2 (1-8)
6) Remissão parcial com terapia mínima	5	20,0%	3,4 (1-9)
7) Recaída	0	0,0%	NA
8) Falha/resistência ao tratamento	4	16,0%	4,75 (2-9)
TOTAL	25	100,0%	3,72(1-9)

N: número de casos; NA: não se aplica; Δt: Tempo médio de seguimento dos pacientes no ambulatório de DBAI do HCFMUSP até o momento final do estudo.

5.1.2 Dados imunohistopatológicos dos pacientes com PH

O exame histopatológico da pele de todos os pacientes com PH foi realizado e revisto por um dermatologista e um dermatopatologista experiente. Observou-se EE em 100% das amostras, e acantólise em 17 (68%) (Tabela 4). Destas, 6/17 (35,3%) exibiram clivagem intraespínhosa média, 4/17 (23,5%) clivagem suprabasal, 3/17 (17,6%) clivagem intraespínhosa baixa, 2/17 (11,7%) clivagem subcórnea, 1/17 (5,9%) clivagem intragranulosa e 1/17 (5,9%) clivagem intraespínhosa alta. A maioria dos pacientes apresentava acantólise leve e focal (9/17, 52,9%) ou moderada (5/17, 29,4%). Acantólise exuberante foi vista em apenas 3 casos, todos de clivagem suprabasal (Anexo 1).

À IFD foram encontrados depósitos fluorescentes intraepidérmicos intercelulares de IgG em 100% (25/25) e de C3 em 88% (22/25) dos casos. Na ZMB, houve depósito de IgG (1/25 – 4%), C3 (1/25 – 4%), IgM (1/25 – 4%) e IgA (1/25 – 4%) nas amostras.

A positividade da IFI foi de 96% (24 pacientes), com títulos variando de 1:40 até 1:5120.

Tabela 4: Achados histopatológicos e de imunofluorescência dos pacientes com pênfigo herpetiforme

	N	%
HISTOPATOLÓGICO	25	100,0%
ESPONGIOSE EOSINOFÍLICA	25	100,0%
ACANTÓLISE	17	68,0%
Subcórnea	2/17	11,7%
Intragranulosa	1/17	5,9%
IE alta	1/17	5,9%
IE média	6/17	35,3%
IE baixa	3/17	17,6%
Suprabasal	4/17	23,5%
IFD	25	100,0%
IgG	25 E 1 ZMB	100,0% 4,0%
C3	22 E 1 ZMB	88,0% 4,0%
IgA	1 ZMB	4,0%
IgM	1 ZMB	4,0%
IFI	25	100,0%
Neg	1	4,0%
1/40	3	12,0%
1/160	7	28,0%
1/320	6	24,0%
1/640	3	12,0%
1/1280	1	4,0%
1/2560	3	12,0%
1/5120	1	4,0%

C3: complemento 3; E: epiderme; IE: intraepidérmica; IFD: imunofluorescência direta; IFI: imunofluorescência indireta; IgA: imunoglobulina A; IgG: imunoglobulina G; IgM: imunoglobulina M; N: número de casos; NE: não especificada; Neg: negativo; ZMB: zona de membrana basal.

5.1.3 Dados demográficos dos controles com PF e PV

Dos 14 casos de PF incluídos no estudo, 42,9% (6/14) eram mulheres e 57,1% (8/14) eram homens, com média de idade de 53,8 anos (intervalo de 26 a 73 anos). A maioria se denominou de pele branca (12/14 – 85,7%), 1 (7,1%) de pele negra e 1 (7,1%) pardo – Tabela 2.

Dentre os 15 casos de PV, a razão feminino: masculino foi de 8:7 (53,3% de mulheres e 46,7% de homens), com idade variando de 30 a 69 anos (média de 44,93 anos). O predomínio foi de pele branca (14/15 – 93,3%) sobre 1 pele parda (6,7%) e pele negra (nenhum paciente) – Tabela 2.

A análise estatística assegurou que cada um dos grupos de comparação PF e PV era semelhante ao grupo de PH considerando idade ($p = 0,91$ para PF e $p = 0,33$ para PV) e gênero dos indivíduos ($p = 0,073$ para PF e $p = 0,16$ para PV).

5.1.4 Avaliação do prurido nos pacientes com PH e nos grupos de PF e PV

Vinte e quatro pacientes com PH, 14 PF e 13 PV foram questionados quanto à presença de prurido. O caso PH4 (Anexo 1) foi considerado inapto a responder e excluído dessa avaliação por apresentar quadro demencial considerável. Dois casos de PV não responderam ao questionamento. A frequência do sintoma foi de 100% no PH (24/24), 71,4% no PF (10/14), e 69,2% no PV (9/13).

Para comparação entre os grupos, utilizou-se a intensidade referida do prurido mensurada pela escala VAS, com valores de 0 (mínimo) a 10 (máximo) atribuídos pelos próprios pacientes. No PH, a média de intensidade do prurido foi de 7,71 (mínimo de 2 e máximo de 10), com desvio padrão de 1,73. Para o PF, a média foi de 2,57 (0 a 8), e desvio padrão de 2,59. Já no PV, os pacientes tiveram uma média de 1,77 (mínimo de 0 e máximo de 4), com desvio padrão de 1,48 (Tabela 5).

Tabela 5: Médias e desvios-padrão da intensidade do prurido e das dosagens de IgE sérica e eosinófilos sanguíneos dos pacientes com pênfigo herpetiforme, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar

	PH		PF		PV	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
Prurido (VAS)	7,71	1,73	2,57	2,59	1,77	1,48
Eosinófilos (/mm³)	376,28	384,50	126,43	118,82	91,33	202,20
IgE (UI/mL)	362,26	393,46	346,85	491,06	91,05	154,02

DP: desvio padrão; IgE: imunoglobulina E; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; VAS: escala analógica visual.

A análise estatística demonstrou que a intensidade do prurido foi significativamente superior no grupo do PH em relação ao PF ($p < 0,0001$) e ao PV ($p < 0,0001$) (Figura 11).

Figura 11: Comparação da intensidade referida do prurido entre os pacientes com pênfigo herpetiforme e os grupos com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar, através da VAS. PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; VAS – escala analógica visual; As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil.

**** $p < 0,0001$

5.1.5 Avaliação da contagem de eosinófilos no sangue dos pacientes com PH e nos grupos de PF e PV

Todos os pacientes com PH, PF e PV apresentaram níveis sanguíneos de eosinófilos medidos.

Observou-se eosinofilia (eosinófilos $> 500/\text{mm}^3$) em 6 (24%) pacientes com PH, com uma contagem média de 367,28 eosinófilos por mm^3 e desvio padrão de 384,50. No PF, a média foi de 126,43 eosinófilos por mm^3 , com desvio padrão de 118,82, e nenhum registro de eosinofilia no sangue periférico. Já no grupo de PV, 1 caso cursou com eosinofilia (6,7%), a média de eosinófilos por mm^3 foi de 91,33 e o desvio padrão de 202,20 (Tabela 5).

A diferença entre a contagem sérica de eosinófilos foi estatisticamente significativa entre PH e PF ($p = 0,0097$) e entre PH e PV ($p < 0,0001$) (Figura 12).

Figura 12: Comparação entre a contagem sanguínea de eosinófilos nos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nos grupos de pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

5.1.6 Avaliação dos níveis séricos de IgE nos pacientes com PH e nos grupos de PF e PV

Os níveis séricos de IgE foram avaliados em 19 casos de PH, 10 de PF e 13 de PV, e estavam aumentados (> 100 UI/mL) em 73,7% (14/19) dos casos de PH, em 60% (6/10) dos casos de PF e em 23,1% (3/13) dos casos de PV. A média foi de 362,26 (desvio padrão 393,46) no PH, 346,85 (desvio padrão 491,06) no PF, e 91,05 (desvio padrão 154,02) no PV (Tabela 5).

Os níveis séricos de IgE nos doentes com PH foram semelhantes aos de PF ($p = 0,3716$) e superiores aos de PV ($p = 0,0012$) (Figura 13).

Figura 13: Comparação dos níveis séricos de IgE entre os pacientes com pênfigo herpetiforme, e os casos de pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. IgE: imunoglobulina E; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. ** $p < 0,01$

Quadro 3: Resumo dos resultados na comparação da intensidade do prurido, da contagem sanguínea de eosinófilos, e dos níveis séricos de IgE entre os pacientes com pênfigo herpetiforme e aqueles com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar

Intensidade do prurido (VAS)

- A intensidade média referida do prurido foi maior no PH em relação ao PF e ao PV;

Eosinófilos:

- A contagem de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes foi maior no PH em relação ao PF e ao PV;

IgE:

- Os níveis séricos de IgE foram superiores no PH em relação ao PV;
- Os níveis séricos de IgE foram semelhantes no PH e no PF.

IgE: imunoglobulina E; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; VAS: escala analógica visual.

5.2 Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica

Foram analisadas as marcações epidérmicas e dérmicas com os anticorpos anti-IL-31, anti-IL-31RA, anti-IL-4, anti-IL17 e anti-TNF α na pele dos pacientes com PH, e nos grupos controle (PF, PV e CS). Para as análises estatísticas, comparou-se a expressão dos marcadores no PH com cada grupo controle individualmente, aferida como porcentagem de área marcada, em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$.

Considerando cada marcador e cada região estudada, foram excluídos os espécimes que não configuravam amostras representativas e/ou que continham artefatos impeditivos da análise.

5.2.1 Análise da expressão cutânea da IL-31

As amostras de 8 CS, 13 pacientes com PF, 15 com PV e 25 com PH foram representativas para análise da IL-31 tanto na epiderme quanto na derme superficial.

A expressão da IL-31 foi significativamente maior no PH em comparação ao PF na epiderme ($p = 0,0045$) e na derme ($p = 0,0196$), e ao PV na epiderme ($p = 0,0404$).

Não houve diferença estatística entre sua expressão dérmica nos pacientes com PH e naqueles com PV ($p = 0,1254$), assim como foi semelhante aos CS em ambas as regiões ($p = 0,0548$ para epiderme e $p = 0,0812$ para derme) (Figuras 14 e 15).

Figura 14: Imuno-histoquímica com anti-IL-31 nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400). CS: controles com pele sã; IL-31: interleucina 31; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar

Figura 15: Comparação entre a expressão de IL-31 na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. CS: controles com pele sã; IL-31: interleucina-31; N: número de casos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.2.2 Análise da expressão cutânea do IL31-RA

Para avaliação da expressão cutânea do IL-31RA, todas as amostras foram representativas (10 CS, 14 PF, 15 PV e 25 PH), e os resultados estão expressos nas figuras 16 e 17.

A expressão epidérmica e dérmica de IL-31RA foi significativamente maior no PH em relação a todos os grupos: CS ($p < 0,0001$ para epiderme e derme), PF ($p = 0,0002$ para epiderme e derme), e PV ($p = 0,0433$ para epiderme e $p = 0,0090$ para derme).

Figura 16: Imuno-histoquímica com anti-IL-31RA nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de expressão membranoso, x400). CS: controles com pele sã; IL-31RA: IL-31 receptor alpha; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar

Figura 17: Comparação entre a expressão de IL-31RA na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. CS: controles com pele sã; IL-31RA: IL-31 receptor alpha; N: número de casos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

5.2.3 Análise da expressão cutânea de IL-31 e IL-31RA em fases evolutivas distintas nos pacientes com PH

Foram avaliados quanto à expressão cutânea de IL-31 e IL-31RA 4 pacientes que dispunham de 2 espécimes de pele colhidos em momentos distintos de evolução do pênfigo: um fragmento colhido durante fase de pênfigo foliáceo não herpetiforme, e um fragmento de biópsia realizada após evolução para PH.

Os resultados mostraram aumento significativo da marcação epidérmica do receptor IL-31RA após evolução para PH ($p = 0,0286$), e semelhança na sua expressão dérmica em ambas as fases da doença ($p = 0,1143$). Também não houve diferença estatística na expressão de IL-31 na epiderme ($p = 0,3429$) ou na derme ($p = 0,6857$) nos dois estágios evolutivos (Figura 18).

Figura 18: Análise da expressão cutânea de IL-31 e de IL-31 RA em fases evolutivas distintas de 4 pacientes com pênfigo herpetiforme. IL-31: interleucina-31; IL-31RA: IL-31 receptor *alpha*; N: número de casos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme;. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. * $p < 0,05$

5.2.4 Análise da expressão cutânea da IL-4

Analisaram-se as amostras representativas de 10 CS, 13 PF, 15 PV e 25 PH.

A expressão de IL-4 cutânea foi significativamente maior nos pacientes com PH quando comparada à epiderme ($p = 0,0004$) e à derme ($p = 0,0029$) do PF, e também à epiderme dos pacientes com PV ($p = 0,0138$). Não houve diferença estatística na comparação com os CS ($p = 0,8435$ para epiderme, e $p = 0,0645$ para derme) ou com a marcação dérmica no PV ($p = 0,2013$), conforme ilustrado nas figuras 19 e 20.

Figura 19: Imuno-histoquímica com anti-IL-4 nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400). CS: controles com pele sã; IL-4: interleucina-4; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar

Figura 20: Comparação entre a expressão de IL-4 na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. CS: controles com pele sã; IL-4: interleucina-4; N: número de casos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.5 Análise da expressão cutânea da IL-17

Todos os espécimes foram representativos para a análise da marcação de IL-17 na pele (10 CS, 14 PF, 15 PV e 25 PH).

Consoante as Figuras 21 e 22, observou-se maior expressão de IL-17 na epiderme dos pacientes com PH em relação ao PF ($p = 0,0025$) e ao PV ($p = 0,0052$). A estatística não foi relevante na comparação com a epiderme dos CS ($p = 0,8435$) ou com a derme de todos os grupos (CS: $p = 0,3771$; PF: $p = 0,6750$; PV: $p = 0,6788$).

Figura 21: Imuno-histoquímica com anti-IL-17 nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400). CS: controles com pele sã; IL-17: interleucina-17; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar

Figura 22: Comparação entre a expressão de IL-17 na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. CS: controles com pele sã; IL-17: interleucina-17; N: número de casos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. ** $p < 0,01$

5.2.6 Análise da expressão cutânea do TNF α

Avaliaram-se todas as amostras de pele do estudo (10 CS, 14 PF, 15 PV e 25 PH) quanto à marcação de TNF α , e os resultados estão representados nas figuras 23 e 24.

A expressão do TNF α foi superior na epiderme do PH comparada ao PF ($p = 0,0008$), porém não houve diferença estatística nas demais comparações considerando-se expressão epidérmica (CS: $p = 0,6275$; PV: $p = 0,0997$) ou dérmica (CS: $p = 0,6022$; PF: $p = 0,0583$; PV: $p = 0,6788$).

Figura 23: Imuno-histoquímica com anti-TNF α nas peles sãs e na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e pênfigo herpetiforme (padrão de marcação citoplasmático, x400). CS: controles com pele sã; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

Figura 24: Comparação entre a expressão de TNF α na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme, e nas peles sãs e de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar. CS: controles com pele sã; N: número de casos; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; TNF α : tumor necrosis factor alpha. As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil. *** $p < 0,001$

Quadro 4: Resumo dos resultados com significância estatística na comparação da expressão de IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-17 e TNF α na pele de doentes com pênfigo herpetiforme e nas peles sãs e de doentes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar

IL-31:

- A expressão epidérmica e dérmica foi maior no PH em relação ao PF;
- A expressão epidérmica foi maior no PH em relação ao PV;

IL-31 RA:

- A expressão epidérmica e dérmica foi maior no PH em relação a todos os grupos de comparação: CS, PF e PV;

IL-4:

- A expressão epidérmica e dérmica foi maior no PH em relação ao PF;
- A expressão epidérmica foi maior no PH em relação ao PV;

IL-17

- A expressão epidérmica foi maior no PH em relação ao PF e ao PV;

TNF α

- A expressão epidérmica foi maior no PH em relação ao PF.

CS: controles com pele sã; IL-4: interleucina-4; IL-17: interleucina-17; IL-31: interleucina-31; IL-31RA: IL-31 receptor *alpha*; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; TNF α : *tumor necrosis factor alpha*.

5.3 Análises de correlação considerando as variáveis clínicas e laboratoriais entre si, e comparadas à expressão cutânea de IL-31 e IL-31 RA nos pacientes com pênfigo herpetiforme

Testes de correlação foram aplicados entre a expressão epidérmica e dérmica da IL-31 e do seu receptor IL-31RA e as seguintes variáveis clínicas e laboratoriais, individualmente: 1- intensidade do prurido medida através do VAS; 2- contagem de eosinófilos no sangue; 3- níveis séricos de IgE; e 4- títulos de autoanticorpos circulantes ao exame de IFI. Não foi encontrada nenhuma correlação significativa.

Ao testar as variáveis clínicas e laboratoriais entre si, observou-se correlação positiva apenas entre o VAS e os eosinófilos sanguíneos ($r = 0,5650$; $p = 0,0040$), conforme figura 25 abaixo.

Figura 25: (A) Correlação positiva entre contagem sanguínea de eosinófilos e intensidade do prurido (VAS) nos pacientes com pênfigo herpetiforme. (B) Ausência de correlação entre contagem sanguínea de eosinófilos e níveis séricos de IgE nos pacientes com pênfigo herpetiforme. IgE: imungoglobulina E; r: coeficiente de correlação de Spearman; VAS: escala analógica visual; ** $p < 0,01$

5.4 Análises de correlação entre as expressões cutâneas dos marcadores IH no pênfigo herpetiforme

5.4.1 Análise de correlação entre a expressão cutânea de IL-4, e as expressões de IL-31 e IL-31RA no pênfigo herpetiforme

A análise estatística evidenciou correlação positiva entre a expressão de IL-4 e de IL31-RA, tanto na epiderme ($r = 0,5800$; $p = 0,0024$) quanto na derme ($r = 0,4877$; $p = 0,0134$) dos pacientes com PH. Os resultados não foram significativos ao comparar as marcações de IL-4 e de IL-31 em nenhuma das regiões estudadas ($p = 0,9041$ para epiderme, e $p = 0,2326$ para derme) (Figura 26).

5.4.2 Análise da correlação entre a expressão cutânea de IL-17, e as expressões de IL-31 e IL-31RA no pênfigo herpetiforme

Houve correlação positiva entre as marcações de IL-17 e do receptor IL-31RA na epiderme ($r = 0,5954$ e $p = 0,0017$) e na derme ($r = 0,5523$ e $p = 0,0042$) do PH (Figura 26). A expressão de IL-17 não correlacionou-se com a de IL-31 no mesmo grupo (epiderme: $p = 0,1473$; derme: $p = 0,1227$).

5.4.3 Análise da correlação entre a expressão cutânea de TNF α , e as expressões de IL-31 e IL-31RA no pênfigo herpetiforme

Na epiderme do PH, a expressão de TNF α correlacionou-se positivamente com a de IL-31RA ($r = 0,4454$ e $p = 0,025$), mas não na derme ($p = 0,1454$) – figura 26. Também não observou-se correlação entre as marcações de TNF α e IL-31 ($p = 0,2053$ para epiderme e $p = 0,1161$ para derme).

Figura 26: Análises de correlação entre as expressões de IL-4, IL-17 e TNF α , e a expressão de IL-31RA na pele dos pacientes com pênfigo herpetiforme. IL-4: interleucina-4; IL-17: interleucina-17; IL-31: interleucina-31; IL-31RA: IL-31 receptor *alpha*; r : coeficiente de correlação de Spearman; TNF α : *tumor necrosis factor alpha*. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$

Quadro 5: Resumo das análises de correlação das variáveis clínicas, laboratoriais e de imuno-histoquímica dos pacientes com pênfigo herpetiforme

Correlações positivas:

- VAS *versus* eosinófilos sanguíneos;
- Expressão epidérmica de IL-4 *versus* expressão epidérmica de IL-31RA;
- Expressão dérmica de IL-4 *versus* expressão dérmica de IL-31RA;
- Expressão epidérmica de IL-17 *versus* expressão epidérmica de IL-31RA;
- Expressão dérmica de IL-17 *versus* expressão dérmica de IL-31RA;
- Expressão epidérmica de TNF α *versus* expressão epidérmica de IL-31RA;

Ausência de correlação estatística:

- VAS, contagem sanguínea de eosinófilos, nível sérico de IgE e títulos da IFI *versus* expressão cutânea de IL-31;
- VAS, contagem sanguínea de eosinófilos, nível sérico de IgE e títulos da IFI *versus* expressão cutânea de IL-31-RA;
- VAS *versus* títulos de IFI;
- VAS *versus* IgE sérica;
- Eosinófilos sanguíneos *versus* IFI;
- IgE sérica *versus* IFI;
- Eosinófilos sanguíneos *versus* IgE sérica;
- Expressão epidérmica e dérmica de IL-4 *versus* expressão epidérmica e dérmica de IL-31, respectivamente.
- Expressão epidérmica e dérmica de IL-17 *versus* expressão epidérmica e dérmica de IL-31, respectivamente;
- Expressão dérmica de TNF α *versus* expressão dérmica de IL-31RA;
- Expressão epidérmica e dérmica de TNF α *versus* expressão epidérmica e dérmica de IL-31, respectivamente.

IFI: imunofluorescência indireta; IgE: imunoglobulina E; IL-4: interleucina-4; IL-17: interleucina-17; IL-31: interleucina-31; IL-31RA: IL-31 *receptor alpha*; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; TNF α : *tumor necrosis factor alpha*; VAS: escala analógica visual.

6 DISCUSSÃO

Pênfigo herpetiforme é uma DBAI rara, que difere clínica e histopatologicamente das outras formas clássicas de pênfigo e possui mecanismos fisiopatogênicos incompletamente elucidados, além de poucos casos relatados na literatura mundial (41).

A revisão da literatura revela cerca de 150 casos, sendo oito os trabalhos que publicaram séries de casos (16, 24-30). Três destas oito publicações foram descritas em áreas endêmicas para PF, duas na Tunísia e uma no Brasil (16, 27), esta última também no nosso serviço (HCFMUSP). Segundo a maior parte das descrições, há predomínio do PH na quinta ou sexta décadas de vida e nos caucasianos, com leve ou nenhuma predileção pelo sexo feminino (26). A faixa etária oscilando entre 16-79 anos com idade média de 51,28 anos, e maior acometimento nos pacientes de pele branca (92%) entre nossos casos de PH foram semelhantes à maioria das publicações (16, 24-26, 28). Quanto ao gênero, as mulheres foram mais afetadas na nossa casuística (19/25, 76%).

Algumas peculiaridades parecem ser próprias aos casos de PH na Tunísia (30): maior prevalência estimada em 9-35% dos casos de pênfigo, início mais precoce do quadro, e todos os casos eram em mulheres com PF, o que sugere a influência de fatores genéticos e ambientais como determinantes da doença. Vale salientar, contudo, que os critérios diagnósticos utilizados naquele estudo diferem dos nossos, visto que EE foi relatada em apenas 42% das pacientes (30).

Portanto, apesar do nosso estudo também ser em um país com focos endêmicos de PF (notadamente em áreas rurais do Centro-Oeste e dos estados de São Paulo, Paraná e Tocantins) (7, 73), nossa população reproduz aspectos epidemiológicos mais semelhantes aos da literatura mundial do que aos reportados na Tunísia (27, 30).

O quadro de PH pode ocorrer de forma isolada, ou associado a um quadro clássico de PV ou PF, e foi variavelmente descrito na literatura. Na Tunísia, todos os relatos foram associados a PF endêmico (27, 30). Na nossa casuística, a maioria (14 / 56%) dos casos desenvolveu-se em pacientes com PF, seja precedendo, seja de início concomitante ou durante o seu curso. Três casos (12%) permaneceram com diagnóstico isolado de PH até o momento final do presente estudo (com 2, 4 e 6 anos de evolução), e 6 associaram-se a PV (24%). Não encontramos na literatura descrições de casos de PH que tenham se desenvolvido concomitante ao fenômeno de *epitope spreading* de PV para PF, como detectamos em 2 dos nossos pacientes. A maior frequência de casos relacionados a PF na nossa população, assim como o desenvolvimento de PH concomitante à mudança de padrão clínico e imunológico para PF em 2 pacientes sugerem que possa haver fatores etiopatogênicos comuns a estas duas variantes.

Quanto aos aspectos clínicos, todos os pacientes apresentaram placas eritematoedematosas circinadas, com ou sem vesículas agrupadas de distribuição herpetiforme, principalmente no abdome e membros proximais, o que é compatível com a descrição clássica do PH e foi considerado critério de inclusão para o presente estudo.

Analogamente aos estudos prévios, prurido foi um sintoma marcante, referido por 100% dos pacientes com PH considerados aptos a responder (24/24), com alta intensidade estimada ao VAS (média de $7,71 \pm 1,73$, numa escala de 0 a 10). Adicionalmente, a intensidade referida do prurido foi significativamente maior no PH quando comparada aos pacientes com PF ($p < 0,0001$) e com PV ($p < 0,0001$). Sabe-se que nos subtipos clássicos de pênfigo, o sintoma mais comum é ardor (de onde vem terminologia “Fogo Selvagem”), e prurido é referido por poucos pacientes (145). Nossos resultados corroboram com os da literatura, e mostram que o prurido, apesar de incomum nos pênfigos clássicos, é sintoma proeminente no PH, e deve chamar atenção para seu diagnóstico, inclusive nos pacientes com diagnóstico pré-estabelecido de PV ou PF.

Acometimento mucoso é raro no PH e descrito em casos isolados (17, 60). Das 8 séries de casos publicadas, cinco delas referiram ausência de envolvimento mucoso em todos os pacientes (26, 27, 29, 30, 60), e uma omitiu este dado (28). Porém, nós encontramos uma frequência maior de lesões na mucosa oral dos nossos pacientes (5/25, 20%), à semelhança do que foi visto por Maciejowska *et al.* (4/15 casos, 26,6%) (24) e por Santi *et al.* (1/7 casos, 14,2%) (16). Um dos pacientes apresentou lesões esofágicas concomitantes às orais. Todos os nossos pacientes com envolvimento oral tinham PV, e houve desaparecimento definitivo do acometimento mucoso em um deles após estabelecimento da variante clínica herpetiforme. Há controvérsias se no PH com produção de anti-Dsg3, estes autoanticorpos reconheceriam sítios antigênicos diferentes daqueles do PV clássico e, por isso, não necessariamente induziriam lesões mucosas (80).

Eosinofilia sanguínea foi encontrada em 6 (24%) dos nossos pacientes, dentro da variação de 15-31% da literatura (11, 26, 30, 42). Além disso, a contagem de eosinófilos no sangue foi significativamente maior no PH em relação ao PF ($p = 0,0097$) e ao PV ($p < 0,0001$). Eosinófilos têm papel importante e encontram-se aumentados em várias outras doenças inflamatórias e autoimunes, o que reduz a especificidade diagnóstica da sua contagem no sangue periférico (146). No contexto das DBAI, eosinófilos parecem ser células efetoras na resposta inflamatória do PB (147), no qual estão aumentados em mais da metade dos casos, mas desconhece-se seu papel nos pênfigos. Acreditamos que a presença de eosinofilia em pacientes com pênfigo deva motivar a suspeita diagnóstica da variante herpetiforme, mas ainda não há dados que suportem seu papel como célula efetora nessa desordem.

Apesar de não haver dados prévios na literatura, nossos pacientes também foram submetidos à dosagem de IgE no soro, e observamos níveis aumentados em 73,7% no grupo com PH (14/19), 60% no PF (6/10) e 23,1% no PV (3/13). Na análise comparativa, a IgE sérica foi maior no PH em relação ao PV, com significância estatística ($p = 0,0012$), mas não houve diferença em relação aos pacientes com PF ($p = 0,3716$). Nenhum estudo

abordou aumento de IgE em pacientes com PH até o presente momento. A IgE está aumentada em desordens alérgicas mediadas pela resposta imune *Th2*, como asma, rinite e DA, e tem papel importante na ativação de eosinófilos, basófilos e mastócitos (92). Altos níveis de IgE foram encontrados no PH, sugerindo participação do mesmo padrão de resposta imune e da própria IgE na patogênese da doença, que carece de maiores esclarecimentos.

Nos pacientes com PH, ao correlacionar a intensidade do prurido, a contagem de eosinófilos no sangue periférico, os níveis séricos de IgE e os títulos de anticorpos à IFI entre si, obtivemos resultados positivos apenas entre a VAS e os eosinófilos sanguíneos ($r = 0,5650$; $p = 0,0040$). Estes resultados sugerem que a contagem sanguínea de eosinófilos parece ser mais importante como determinante da intensidade dos sintomas, do que como medida de atividade de doença, visto que não houve correlação com os títulos da IFI. Porém, devemos considerar a variação dos subtipos de IgG produzidos conforme a progressão do PH. Não se sabe quais subclasses de IgG são patogênicas no PH, e a presença de anticorpos não patogênicos poderia justificar a manutenção de níveis elevados de IgG, mesmo durante as fases de remissão da doença, a exemplo do que acontece no PF e no PV (49). Por esse motivo, a IFI não pode ser utilizada exclusivamente para definir o prognóstico e a atividade da doença. Consequentemente, o resultado apresentado não exclui a possibilidade de os parâmetros laboratoriais influenciarem na atividade clínica do PH.

Com relação à análise AP, EE é o aspecto mais relevante do PH, apesar de inespecífica. Também pode ser encontrada em casos iniciais de PF e PV clássicos, assim como em outras dermatoses inflamatórias (148). No PH, a EE é descrita na grande maioria dos casos e pode associar-se a clivagem intraepidérmica, com ou sem acantólise leve (44).

Nosso estudo considerou EE como critério diagnóstico obrigatório do PH, estando portando presente em 100% dos casos. Acantólise foi detectada em 68% (17/25) dos

pacientes após revisão de todas os exames AP, sendo a maioria leve (52,9%) ou moderada (29,4%). Três pacientes apresentaram acantólise suprabasal exuberante. Há uma grande variação na literatura quanto à frequência de acantólise no AP do PH (de 12,5% a 60% dos pacientes), e quando está presente, é descrita como leve ou mínima (28-30, 61). Esse achado esteve mais presente na nossa casuística, inclusive foi exuberante em 3 dos nossos pacientes. Curiosamente, esses dados foram discrepantes quando comparados aos publicados por Santi *et al.* (16), que encontraram apenas 28,5% de acantólise em 7 pacientes com PH acompanhados no mesmo serviço de dermatologia do presente estudo. A maior proporção de acantólise nos nossos pacientes pode ser atribuída à busca ativa por acantólise durante o processo de revisão dos fragmentos histológicos do estudo, assim como à experiência adquirida pelos dermatologistas e patologistas do nosso serviço com o número crescente de casos de PH ao longo dos anos, o que pode ter aumentado o índice de suspeição clínica e AP. As hipóteses aventadas para explicar a baixa frequência de acantólise no PH incluem a participação de interleucinas específicas (47, 48, 86, 149), o reconhecimento de epítomos diferentes e funcionalmente menos importantes da Dsg1 e Dsg3 (75, 150), a produção de autoanticorpos anti-Dsc (76, 151-154), ou mesmo contra porções não desmossômicas das proteínas de ligação (86).

A presença de EE em um contexto clínico sugestivo de PH sinaliza a necessidade de pesquisar autoanticorpos através da IF, método de escolha para sua confirmação diagnóstica (44, 54). Nossa casuística teve 100% de positividade para IgG na IFD, e 88% para C3, com padrão intraepitelial intercelular. Quanto à IFI, esta foi positiva em 24 pacientes (96%). Os resultados corroboram a importância da IF como ferramenta diagnóstica mais sensível e específica no diagnóstico dos pênfigos, sendo especialmente importante no contexto do PH com EE isolada ao exame AP.

PH é considerada de bom prognóstico e com boa resposta ao tratamento na maioria dos casos, sendo a DDS a medicação de escolha por muitos autores (41).

Na nossa casuística, todos os pacientes necessitaram de terapia sistêmica. A prednisona foi a medicação mais prescrita (100% dos pacientes), e 14 (56%) deles necessitaram da associação de uma segunda droga imunossupressora e/ou anti-inflamatória (Anexo 2). Quatro casos (16%) mantiveram-se refratários aos tratamentos sistêmicos otimizados, e apenas 6 (24%) encontravam-se em remissão completa com ou sem terapia até o momento final do estudo. A DDS foi utilizada em apenas 3 pacientes, 2 dos quais evoluíram com efeitos colaterais que justificaram sua suspensão (hemólise, anemia, hepatotoxicidade) – Anexo 2.

Nossos achados foram mais concordantes com os de Santi *et al.* (16) e Jerbi *et al.* (30). O índice de remissão completa com ou sem terapia foi baixo, e a maioria manteve-se em remissão parcial com necessidade de medicações sistêmicas, após uma média geral de 3,72 anos de seguimento. Além disso, uma porcentagem não desprezível foi refratária aos imunossupressores, o que já havia sido relatado em casos isolados na literatura (39, 63). Não houve mortes pelo PH até o momento final do estudo. Nossos achados sugerem que o PH possa ter um curso mais refratário do que postulado, e reforça a necessidade da obtenção de terapêuticas mais efetivas.

Quadro 6: Comparação entre as características clínicas, laboratoriais e evolução dos pacientes com pênfigo herpetiforme publicados na literatura vs. dados do presente estudo

	PH (Literatura)	PH (Tunísia)	PH (presente estudo)
Idade	5ª e 6ª décadas	Média 34,2 anos	Média 51,28 anos
Gênero	Discreto ou nenhum predomínio no gênero feminino	Exclusivo do gênero feminino	Predomínio no gênero feminino (76%)
Cor	Predomínio nos caucasianos	Predomínio nos caucasianos	Predomínio na pele branca (92%)
Prurido	80 a 100%	91%	100%
Acometimento de mucosas	Raro	Nenhum	20%
Eosinofilia sanguínea	15 a 31%	20,8%	24%
Aumento de IgE	Não descrito	Não descrito	73,7%
EE	Grande maioria	37,5 – 100%	100%
Acantólise	12,5 a 60%	41,6%	68%
Tratamentos	DDS é considerada droga de escolha pela maioria dos autores	DDS + corticoide sistêmico	Prednisona em todos os pacientes; DDS foi mal tolerada e usada em apenas 3 casos (12%); 56% necessitaram 1 ou mais drogas imunossupressoras / anti-inflamatórias adicionais.
Evolução e prognóstico	Considerada de curso benigno e boa resposta ao tratamento; poucos casos refratários.	Todos os casos necessitaram associar 2 drogas (DDS + corticoide sistêmico), com remissão em 64% dos casos.	24% de remissão completa com ou sem terapia; 60% de remissão parcial; 16% refratários ou com falha terapêutica;

DDS: dapsona; EE: espongiose eosinofílica; IgE: imunoglobulina E; PH: pênfigo herpetiforme.

Quanto à avaliação IH, os resultados da expressão cutânea de IL-31 e IL-31RA do nosso trabalho são os listados a seguir:

1. A expressão epidérmica de IL-31 foi maior no PH em comparação ao PF ($p=0,0045$) e ao PV ($p = 0,0404$), e semelhante aos CS. A expressão dérmica foi superior no PH em relação ao PF ($p = 0,0196$) apenas, e estatisticamente semelhante ao PV e aos CS;
2. O receptor IL31-RA foi mais expresso na pele dos pacientes com PH em relação a todos os grupos, com alto grau de significância estatística, tanto na epiderme (CS: $p <0,0001$; PF: $p = 0,0002$; PV: $p = 0,0433$) quanto na derme (CS: $p <0,0001$; PF: $p = 0,0002$; PV: $p = 0,0090$);

Sabe-se que a IL-31 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células *Th2* e tem influência na indução do prurido, notadamente na DA e outras doenças alérgicas (155). Sua resposta é mediada pela ligação ao receptor expresso nos queratinócitos e nas terminações nervosas da pele, sendo o IL-31RA o mais determinante nos processos cutâneos. (114). Além do potencial pruritogênico, a IL-31 parece contribuir para o recrutamento de células inflamatórias e aumenta o dano à barreira cutânea, facilitando a penetração de alérgenos e patógenos (114).

No contexto das DBAI, a IL-31 foi estudada apenas na DH e no PB, sem trabalhos abordando-a no PH. Tanto seus níveis séricos quanto sua expressão cutânea foram maiores nos pacientes com DH e PB em relação a controles saudáveis (141). Rüdrieh *et al.* evidenciaram aumento nas concentrações de IL-31 no fluido de bolhas de pacientes com PB, e concluíram que os eosinófilos são a principal fonte celular produtora de IL-31 naquela desordem (142).

Os resultados acima demonstram predominância da IL-31 no PH quando comparada ao PV e ao PF, e mais notadamente do seu receptor IL-31RA na pele de doentes com PH em relação a todos os grupos de comparação, o que sugere que as

vias de sinalização da IL-31 devam ter papel na patogênese da doença e dependam essencialmente da maior expressão do IL-31RA, especialmente na epiderme.

Essa hipótese é corroborada pelo aumento relevante da expressão do IL-31RA, mas não da IL-31, na epiderme de um grupo de pacientes com PF após terem desenvolvido a variante herpetiforme.

Bilsborough *et al.* (156) estudaram a pele de pacientes com DA por meio das técnicas de IH e PCR (reação de polimerase em cadeia) e compararam-nas com amostras de pele sã. Em conformidade com os nossos achados, os níveis de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) de IL-31 não foram significativamente diferentes entre as amostras de pacientes com DA e indivíduos sadios, apesar de ter havido tendência a maior expressão da IL-31 na pele doente. Adicionalmente, os autores encontraram que o IL-31RA foi expresso pelos queratinócitos de ambos os grupos, mas seus níveis foram consistentemente superiores nas amostras de pele com DA, indicando um aumento no potencial de resposta à IL-31 dependente do aumento do seu receptor na pele desses pacientes (156).

Considerando os demais marcadores estudados, os resultados foram:

3. A IL-4 foi mais expressa na epiderme ($p = 0,0004$) e na derme ($p = 0,0029$) do PH em relação ao PF. A marcação epidérmica também foi superior ao PV ($p = 0,0138$). Não houve diferença estatística nas demais comparações;
4. A IL-17 foi mais expressa na epiderme do PH do que no PF ($p = 0,0025$) e no PV ($p = 0,0052$), sem outros resultados relevantes;
5. O TNF α teve maior marcação epidérmica no PH em relação ao PF apenas ($p = 0,0008$), sem mais diferenças consideráveis.

Observamos, ainda, que as expressões cutâneas de IL-4, IL-17 e TNF α correlacionaram-se positivamente com a do receptor IL-31RA nos pacientes com PH. Porém, não foi encontrada correlação entre nenhum dos marcadores acima e a IL-31,

ao contrário do trabalho de Raap *et al.*, no qual houve correlação positiva entre os níveis séricos de IL-31 e os de IL-4 e IL-13 em crianças com DA (126).

Os mecanismos reguladores da expressão da IL-31 e do IL-31RA são pouco compreendidos.

Nossos resultados reafirmam aqueles de Edukulla *et al.*, segundo os quais, as citocinas IL-4 e IL-13 estimularam a expressão de IL-31RA nos macrófagos peritoneais e derivados de medula óssea de murinos, sugerindo um importante papel regulatório das citocinas Th2 (125). Além disso, foi demonstrado que o IFN γ estimula aumento da expressão de IL-31RA nos queratinócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (120, 122, 123). Esse receptor também pode ser induzido pela própria IL-31 nos gânglios nervosos cutâneos em murinos (124), e por toxinas estafilocócicas em macrófagos e monócitos de humanos (157). A influência dos demais marcadores inflamatórios na interação entre IL-31 e seu receptor não foi abordada em estudos.

Nossos achados acrescentam que, além de citocinas Th2, mediadores adicionais - como IL-17 e TNF α - parecem participar da resposta imunológica do PH e modular as vias de sinalização da IL-31 (158). Esse perfil de citocinas lembra aquele descrito na DA, na qual a IL-31 é a citocina indutora do prurido, IL-4 e TNF α foram associadas à redução da expressão cutânea de filagrina, e como resposta aos defeitos da barreira cutânea e à presença de antígenos, o sistema imune adaptativo aumenta a expressão de citocinas Th2, Th22 e Th17 predominantemente na fase aguda da doença (159, 160). A participação da resposta Th17 foi descrita na DA, mas é crucial na patogênese da psoríase, na qual a IL-17 atua em sinergismo com o TNF α e a IL-22 ao induzir a produção de peptídeos antimicrobianos pelos queratinócitos (161).

A conjunção dos resultados acima sugere que a participação patogênica da IL-31 no PH depende essencialmente da maior expressão cutânea do seu receptor IL-31 RA. Além disso, o balanço das citocinas de diferentes padrões de resposta imune, incluindo

IL-4, IL-17 e TNF α , pode ser determinante na indução da sua maior expressão cutânea, notadamente na epiderme, sítio etiopatogênico dos pênfigos.

Visto que a marcação epidérmica de todos os mediadores estudados e a expressão dérmica de parte deles no PH foi estatisticamente superior ao PF e ao PV, é possível que estejam fundamentalmente envolvidos na distinção etiopatogênica entre as variantes clássicas e herpetiforme dos pênfigos. O processo inflamatório culminaria no aumento da expressão de IL-31RA, amplificando as respostas dependentes de IL-31 naqueles pacientes que evoluem para pênfigo herpetiforme.

A correlação entre os níveis de IL-31 na pele ou no sangue e a atividade ou gravidade de diversas doenças foi abordada por alguns autores. Demonstrou-se correlação positiva entre IL-31 sérica e a gravidade do quadro em desordens como mastocitose, asma e DA (111, 117, 127-132). Nattkemper *et al.* estudaram a pele de doentes com leucemia cutânea de células T e encontraram correspondência entre os níveis cutâneos de IL-31 e IL-31RA com a gravidade do quadro, e também com a intensidade do prurido (129). Nos doentes mais graves, houve maior marcação de IL-31 na epiderme e na derme. Apenas os níveis epidérmicos de IL-31RA tiveram relação com a intensidade do prurido nesse estudo (129).

Já na DA, os resultados são conflitantes ao correlacionar a expressão sérica ou cutânea da IL-31 com a intensidade do prurido, gravidade da doença ou com os níveis séricos de IgE (110, 111, 117, 126, 136, 137).

No nosso trabalho, não encontramos correlação estatisticamente significativa entre a expressão de IL-31 ou IL-31 RA e nenhuma das seguintes variáveis: intensidade do prurido, contagem sanguínea de eosinófilos, níveis séricos de IgE, e títulos de anticorpos na IFI. Ressaltamos que a ausência de correlação com os títulos de IFI não permite concluir que a interação IL-31/IL-31RA não influencie na atividade da doença, pois é necessário considerar a variação dos subtipos de IgG conforme a progressão da doença, que podem ser patogênicos ou não.

Por fim, o maior entendimento sobre os mecanismos que promovem a formação de lesões nos pênfigos ampliou-se ao longo dos anos, contribuindo para a redução de mortalidade e a descoberta de novos alvos terapêuticos. No entanto, os tratamentos baseiam-se primordialmente no uso de corticoterapia sistêmica e imunossupressores a longo prazo, o que pode acarretar em um grande espectro de efeitos colaterais potencialmente graves aos usuários (162). Além disso, a escolha do tratamento ideal no PH é desafiadora. A casuística mundial é pequena e os dados na literatura são insuficientes para fornecer boas evidências científicas a respeito do seu manejo adequado.

Elucidar etapas importantes da fisiopatogenia de qualquer doença é indispensável para a busca de novas alternativas terapêuticas eficazes e com melhor perfil de segurança, garantindo melhoria na qualidade de vida dos seus portadores.

O bloqueio do IL-31RA com um anticorpo monoclonal humanizado (Nemolizumabe) tem sido estudado no tratamento da DA e tem se mostrado eficaz em reduzir prurido e gravidade da dermatite em pacientes com doença moderada a grave (139, 140). Um anticorpo anti-IL-31 também está em estudo para o mesmo fim (114).

A exemplo dos ensaios clínicos em andamento para DA, os resultados apresentados motivam o estudo dos medicamentos que bloqueiem a sinalização mediada pela IL-31 como opção terapêutica para o PH.

Quadro 7: Comparação entre os achados imuno-histoquímicos do presente estudo vs. as descrições da literatura

	Literatura	Presente estudo
IL-31	Sem trabalhos no PH; Níveis séricos e cutâneos foram maiores na DH e no PB em relação a CS (141, 142); Níveis séricos e/ou cutâneos foram aumentados na DA, DCA, UCE, prurigo nodular, linfoma cutâneo e mastocitose (111, 117, 127-132); Marcação cutânea e níveis de RNAm na pele na DA foram semelhantes aos CS (156).	Houve predomínio da expressão cutânea no PH em relação ao PF e ao PV; A marcação na pele do PH foi semelhante à dos CS; Sem diferença na expressão cutânea num grupo de pacientes que evoluiu de PF para PH;
IL-31RA	Sem trabalhos no PH; Demonstrou-se maior expressão na pele de pacientes com DA comparados a CS (156).	Houve maior expressão cutânea no PH comparada aos CS, PF e PV; Houve aumento da expressão cutânea na epiderme de um grupo de pacientes que evoluiu de PF para PH;
Outras citocinas	Sem estudos no PH.	IL-4 e IL-17: foram mais expressas na pele do PH comparadas ao PF e PV; TNF α : foi mais expresso na pele do PH em relação ao PF.
Interação entre outras citocinas pró-inflamatórias e resposta mediada por IL-31	Houve correlação positiva entre níveis séricos de IL-31 e os de IL-4 e IL-13 em crianças com DA (126); IL-4 e IL-13 aumentaram expressão de IL-31RA nos macrófagos de murinos (125); IFN γ foi capaz de aumentar a expressão de IL-31RA em queratinócitos e células inflamatórias(120, 122, 123); IL-31 estimulou o aumento de IL-31RA nos gânglios sensoriais da pele em murinos (124); Sem estudos para os demais marcadores.	As expressões cutâneas de IL-4, IL-17 e TNF α correlacionaram-se positivamente com a do receptor IL-31RA na pele do PH, e não houve correlação com a marcação da IL-31;
Correlação entre resposta mediada por IL-31 e gravidade do prurido / da doença	Níveis séricos de IL-31 correlacionaram-se com intensidade do prurido na DA (110, 111) e leucemia cutânea (129); Resultados divergentes quanto à correlação entre níveis séricos e/ou na pele da IL-31 e os níveis de IgE no soro ou a gravidade da DA (117, 126, 136, 137); Houve correspondência entre os níveis de IL-31 e IL-31RA na pele e a gravidade da leucemia cutânea(129).	Não houve correlação entre a expressão cutânea de IL-31 ou de IL-31RA na pele dos pacientes com PH e nenhum dos seguintes parâmetros: intensidade do prurido, contagem de eosinófilos no sangue periférico, níveis séricos de IgE, e títulos de anticorpos à IFI.

CS: controles com pele sã; DA: dermatite atópica; DCA: dermatite de contato alérgica; DH: dermatite herpetiforme; IFN γ : interferon gama; IgE: imunoglobulina E; IL: interleucina; IL-31RA: IL-31 receptor *alpha*; PB: penfigóide bolhoso; PF: pênfigo foliáceo; PH: pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; RNAm: ácido ribonucleico mensageiro; Th2: T *helper* 2; TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*; UCE: urticária crônica espontânea.

7 CONCLUSÕES

Quanto à caracterização demográfica, clínica, diagnóstica e evolutiva do pênfigo herpetiforme:

- Na nossa população, o PH é mais frequente em pacientes do sexo feminino, de pele branca e com média de idade de 51,28 anos;
- Prurido é sintoma proeminente e presente em todos os casos, eosinofilia no sangue periférico ocorre em cerca de 24%, e há alta frequência de IgE sérica elevada nos doentes com PH (73,7%);
- EE é vista em 100% e acantólise é observada em 68% dos casos, a maioria de grau leve ou moderado, e a clivagem mais frequente é a intraespinhosa média (35,5%);
- O tratamento mais utilizado na nossa população foi corticosteroide sistêmico, e 56% dos casos precisaram da associação de pelo menos uma droga sistêmica adicional;
- O curso evolutivo dos pacientes parece ter pior prognóstico na nossa população em relação à literatura.

Quanto à comparação entre grupos estudados (PH, PV, PF e CS):

- O prurido é mais intenso no PH em relação ao PF e ao PV;
- A contagem de eosinófilos no sangue é superior no PH em relação ao PF e ao PV;
- O nível sérico de IgE é maior no PH do que no PV, e semelhante ao PF;
- A expressão de IL-31 na pele é maior no PH em relação ao PF (epiderme e derme) e ao PV (apenas epiderme); e é semelhante aos CS;
- A expressão do receptor IL-31RA na pele do PH é superior ao PF, PV e aos CS;

- A expressão do receptor IL-31RA aumenta na progressão de PF para PH, numa mesma população;
- A expressão de IL-4 na pele é maior no PH em relação ao PF (epiderme e derme) e ao PV (apenas epiderme); e é semelhante aos CS;
- A expressão de IL-17 é maior na pele do PH em comparação ao PF (apenas epiderme) e ao PV (apenas epiderme), e semelhante aos CS;
- A expressão de TNF α é maior no PH em relação ao PF (apenas epiderme), e semelhante ao PV e aos CS.

Quanto à correlação de achados nos pacientes com PH:

- A intensidade do prurido correlaciona-se positivamente com a contagem sanguínea de eosinófilos, porém não com a IgE sérica ou com os títulos da IFI;
- Não há correlação entre a expressão cutânea de IL-31 ou IL-31RA e a contagem de eosinófilos no sangue, a IgE sérica, a intensidade do prurido ou os títulos de anticorpos à IFI;
- Há correlação positiva entre a expressão cutânea de IL-4, IL-17 e TNF α com a de IL-31RA;

Os resultados do presente estudo sugerem que o PH seja desordem predominantemente Th2 mediada, e que a sinalização imunológica mediada pela IL-31 e seu receptor IL-31RA desempenhem papel na fisiopatogenia do PH. A maior expressão cutânea de IL31-RA na pele é provavelmente o fator mais determinante dessa resposta, e parece ser influenciada pela interação de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-4, IL-17 e TNF α . Estes resultados influenciam pesquisas futuras e permitem estudar os novos medicamentos antiIL-31 e seu receptor como possibilidades terapêuticas em potencial para o PH.

8 ANEXOS

ANEXO 1: DADOS DEMOGRÁFICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM PÊNFIGO HERPETIFORME

PCTE	DADOS DEMOGRÁFICOS			DIAGNÓSTICO		MUCOSA*	VAS	LABORATÓRIO		HISTOPATOLOGIA			IFD				IFI
	SEXO	ID	COR	INÍCIO	FINAL			IgE	EOS	ACANTÓUSE	NÍVEL	GRAU	IgG	C3	IgM	IgA	
PH1	F	75	BR	PV	PV H	N	9	ND	400	NÃO	NA	NA	E	E	NEG	NEG	1/160
PH2	F	26	BR	PH	PH	N	9	ND	400	NÃO	NA	NA	E	E	ZMB	ZMB	1/160
PH3	F	30	BR	PH	PV H	N	8	ND	600	SIM	IE baixa	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/160
PH4	F	79	BR	PH	PH	N	NA	988	270	SIM	IE média	MOD	E	E	NEG	NEG	1/160
PH5	F	52	BR	PF H	PF H	N	8	19	318	SIM	IE baixa	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/160
PH6	M	26	BR	PF	PF H	N	8	203	132	SIM	IE média	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/640
PH7	F	46	BR	PV	PV H	ORAL	7	ND	100	NÃO	NA	NA	E	NEG	NEG	NEG	1/160
PH8	F	38	BR	PF	PF H	N	8	336	120	SIM	IE média	MOD	E	E	NEG	NEG	1/2560
PH9	F	55	BR	PV	PF H	N	8	ND	100	SIM	IG	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/320
PH10	F	71	NE	PH	PH	N	5	82	80	SIM	SC	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/1280
PH11	F	63	BR	PV H	PV H	ORAL	10	376	620	SIM	SB	INT	E	E	NEG	NEG	1/2560
PH12	F	55	BR	PF H	PF H	N	9	230	542	SIM	IE média	MOD	E	E	NEG	NEG	1/40
PH13	F	31	PD	PF	PF H	N	5	52	320	NÃO	NA	NA	E	E	NEG	NEG	1/2560
PH14	F	21	BR	PV H	PV H	ORAL	8	263	1320	SIM	SB	MOD	E	E	NEG	NEG	1/640
PH15	F	79	BR	PV	PV H	ORAL ESO	10	336	820	SIM	SB	INT	E	E	NEG	NEG	NEG
PH16	F	38	BR	PF H	PF H	N	7	196	100	NÃO	NA	NA	E	E	NEG	NEG	1/320
PH17	M	67	BR	PV	PF H	N	9	29	240	NÃO	NA	NA	E	E	NEG	NEG	1/320
PH18	M	63	BR	PF	PF H	N	8	339	40	SIM	IE alta	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/40
PH19	M	71	BR	PF	PF H	N	7	710	140	NÃO	NA	NA	E	E	NEG	NEG	1/160
PH20	M	16	BR	PF H	PF H	N	8	121	1580	SIM	SC	LEVE	E	NEG	NEG	NEG	1/5120
PH21	F	79	BR	PF	PF H	N	8	ND	200	NÃO	NA	NA	E	E	NEG	NEG	1/320
PH22	M	46	BR	PF	PF H	N	2	90	30	SIM	IE média	MOD	E + ZMB	E + ZMB	NEG	NEG	1/320
PH23	F	77	BR	PF H	PF H	N	8	560	130	SIM	IE baixa	LEVE	E	NEG	NEG	NEG	1/40
PH24	F	19	BR	PV	PV H	ORAL	9	320	260	SIM	SB	INT	E	E	NEG	NEG	1/320
PH25	F	59	BR	PF	PF H	N	7	1633	320	SIM	IE média	LEVE	E	E	NEG	NEG	1/640

BR: raça branca; C3: complemento 3; E: epidérmico intercelular; ESO: esôfago; EOS: eosinófilos sanguíneos (/mm³); F: feminino; ID: idade ao diagnóstico; IE: intraespinhosa; IG: intragranulosa; IFD: imunofluorescência direta; IFI: imunofluorescência indireta; IgA: imunoglobulina A; IgE: imunoglobulina E sérica, em UI/mL; IgG: imunoglobulina G; INT: intensa; M: masculino; MOD: moderada; N: não; NA: não aplicável; ND: não disponível; NE: raça negra; NEG: negativo; PCTE: paciente; PD: pardos; PF: pênfigo foliáceo; PF H: pênfigo foliáceo herpetiforme; PH: pênfigo herpetiforme; PH 1 a 25: casuística com pênfigo herpetiforme; PV: pênfigo vulgar; PV H: pênfigo vulgar herpetiforme; SB: suprabasal; SC: subcórnea; VAS: escala analógica visual de prurido; ZMB: zona de membrana basal; * acomentimento mucoso durante a variante herpetiforme apenas.

ANEXO 2: DADOS REFERENTES AOS TRATAMENTOS REALIZADOS, EVOLUÇÃO E COMORBIDADES ASSOCIADAS DOS PACIENTES COM PÊNFIGO HERPETIFORME

PACIENTE	Tratamentos sistêmicos **	Complicações relacionadas ao TTO	EVOLUÇÃO	COMORBIDADES
PH1	Pred, doxi		5	HAS, DLP, fibromialgia, OPO
PH2	Pred		2	Hipertrigliceridemia, OPO, Meningioma
PH3	Pred, hidro, DDS, AZA, MMF	Hemólise	8	DM, obesidade, DLP, TB latente
PH4	Pred		5	HAS, Alzheimer, OPN
PH5	Pred		5	Megacólon Chagásico
PH6	Pred, doxi, AZA, MMF, Rituxi	Hepatotoxicidade	8	OPN
PH7	Pred, MMF		5	OPN
PH8	Pred, doxi, MMF	VV, <i>Tinea corporis</i>	8	Obesidade
PH9	Pred, MMF, DDS		2	DLP, OPO
PH10	Pred		5	HAS, DM
PH11	Pred, MMF	CMV TGI, múltiplas infecções, GESF	8	HAS, DLP, DPOC, DRGE, Timoma
PH12	Pred		6	HAS, OPN
PH13	Doxi, AH, DDS	Anemia, hepatotoxicidade - DDS	6	DM
PH14	Pred		3	HAS
PH15	Pred		5	HAS, DRGE, IVP, OPO, cisto renal
PH16	Pred, MMF		5	HAS
PH17	Pred, doxi		5	HAS, DM, DLP, DAC, DAOP, micobacteriose cutânea, AdenoCa de ceco
PH18	Pred		6	HAS, DRC
PH19	Pred		6	HAS, DM
PH20	Pred, MMF		5	OPN
PH21	Pred, AH		2	DM, DLP
PH22	Pred, hidro, doxi	Glaucoma	6	Glaucoma
PH23	Pred, hidro, doxi		3	HAS, glaucoma, depressão, catarata
PH24	Pred		5	OPN
PH25	Pred, deflazacort		3	OPN

AdenoCa: adenocarcinoma AH: anti-histamínicos; AZA: azatioprina; CMV: citomegalovirose; DAC: doença arterial coronariana; DAOP: doença arterial obstrutiva periférica; DDS: dapsona; DLP: dislipidemia; Doxi: doxiciclina; DM: diabetes mellitus; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; DRC: doença renal crônica; DRGE: doença do refluxo gastroesofágico; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; HAS: hipertensão arterial sistêmica; Hidro: hidrocortisona; IVP: insuficiência venosa periférica; MMF: micofenolato de mofetila; OPN: osteopenia; OPO: osteoporose; PH 1 a 25: casuística com pênfigo herpetiforme; Pred: prednisona; Rituxi: rituximabe; TGI: trato gastrointestinal; VV: verrugas vulgares; Estágios de evolução: 1: Controle; 2: Remissão completa sem terapia; 3: Remissão completa com terapia; 4: Remissão parcial sem terapia; 5: Remissão parcial com terapia; 6: Remissão parcial com terapia mínima; 7: recaída; 8: Falha ou resistência terapêutica. **Corticosteroides tópicos e/ou inibidores da calcineurina tópicos foram associados em todos os pacientes;

ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - “Pênfigo herpetiforme: avaliação da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na expressão da interleucina-31 (IL-31)”.

Pesquisador principal – Professora Doutora Valéria Aoki (Inscrição Conselho Regional: nº 60080)

Departamento/Instituto – Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP)

Duração da Pesquisa: 02 anos

Convidamos o(a) Sr.(a) a participar voluntariamente deste estudo sobre uma doença bolhosa crônica da pele chamada Pênfigo Herpetiforme. Para que você possa tomar uma decisão se quer ou não participar deste estudo, este documento descreve o objetivo do estudo, seus direitos e os possíveis benefícios e riscos de participação. Leia as informações com calma e sinta-se à vontade para decidir se é do seu interesse participar desta pesquisa. Se tiver alguma dúvida, pergunte ao médico do estudo para obter mais esclarecimentos.

Quais são os objetivos do estudo?

O estudo tem como objetivo entender melhor os mecanismos que causam o pênfigo herpetiforme, que é uma doença bolhosa crônica da pele. Assim, o surgimento de novos conhecimentos podem ajudar a esclarecer dúvidas e serão muito importantes para melhorar o tratamento e o seguimento dos pacientes com a doença.

Quais procedimentos serão realizados?

Serão avaliados fragmentos de pele que foram previamente obtidos através de biópsia e amostras de sangue coletadas com autorização dos pacientes, durante seu acompanhamento habitual no ambulatório de dermatologia. As biópsias foram realizadas após injeção de anestesia, retirada de um fragmento de pele de 4mm de diâmetro, fechamento do local da cirurgia por pontos com fio de Nylon e cobertura com curativo. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com agulha (scalpe 23) acoplado a conector a vácuo em tubo seco e o soro foi obtido após centrifugação. Os exames foram feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para os participantes do estudo.

Quais os possíveis riscos e desconfortos decorrentes da participação na pesquisa?

Ao participar da pesquisa, o paciente continuará seu seguimento habitual no ambulatório de dermatologia, e seu tratamento não será influenciado pelo estudo. Talvez seja preciso colher novos exames de sangue juntamente com os exames habituais do seu acompanhamento, caso o participante permita, o que pode causar algum desconforto durante a coleta.

Quais são os benefícios do estudo?

Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que visa analisar porque pacientes com pênfigo herpetiforme tem apresentação clínica e laboratorial diferente das formas clássicas de pênfigo. No entanto, o maior conhecimento sobre esta doença pode melhorar a assistência à saúde dos doentes.

Como será o acompanhamento e a assistência durante o estudo? Quais são os direitos dos participantes?

Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório da dermatologia. Todos os participantes do estudo terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento. Os pacientes podem em qualquer momento não concordar em fazer os exames que eventualmente serão pedidos.

É garantido aos participantes a liberdade de recusar-se ou retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem penalização alguma, de sigilo e privacidade, e sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles. Os pesquisadores comprometem-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. O material biológico (fragmento de pele e soro) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 e será pedido novo consentimento para caso de uso futuro. Toda pesquisa só será realizada com a aprovação do sistema CEP/CONEP.

Os participantes terão o direito de manterem-se atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas.

Há alguma despesa para o participante da pesquisa?

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.

Caso aceite participar da pesquisa, em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Profª Dra. Valéria Aoki, que pode ser encontrada no endereço. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia CEP: 05403-000, Telefone (11) 2661-6398, e-mail dermatologia.ichc@hc.fm.usp.br. Também poderá entrar em contato com a pesquisadora Karina Lopes Moraes, no mesmo endereço e telefone. 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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Pênfigo herpetiforme: avaliação da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na expressão da interleucina-31 (IL-31)”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Dra. Valéria Aoki) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (Dra. Karina Lopes) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

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 Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

ANEXO 4: CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA- CAPPESQ DO HCFMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pênfigo herpetiforme: avaliação da resposta imune adaptativa cutânea, com ênfase na expressão da interleucina-31 (IL-31).

Pesquisador: Valeria Aoki

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57070616.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.633.103

Apresentação do Projeto:

Estudo retrospectivo, através de prontuários e exames de pacientes portadores de Penfigo herpetiforme, vulgar e foliaceo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão da IL-31 e seus recaptadores IL-31RA e OSMR na pele de pacientes portadores de penfigo herpetiforme, através da técnica de imunohistoquímica, além da avaliação da dosagem sérica de IgE e eosinófilos. Comparar os achados com pacientes saudáveis e com pacientes portadores de penfigo foliaceo e vulgar quanto a expressão de IL-31, IL-31RA e OSMR e níveis de IgE e eosinófilos. Correlacionar dados demográficos, clínicos e aspectos histológicos, em pacientes atendidos no período de 2001. a 2015

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos envolvidos por se tratar de projeto retrospectivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há questionamentos de natureza ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.633.103

Recomendações:

APROVADO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO SEM PENDÊNCIAS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_716136.pdf	15/06/2016 18:57:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_.docx	15/06/2016 17:07:09	Valeria Aoki	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_.doc	15/06/2016 17:06:51	Valeria Aoki	Aceito
Outros	cadastro_online.pdf	15/06/2016 10:57:06	Valeria Aoki	Aceito
Outros	declaracao.pdf	15/06/2016 10:54:34	Valeria Aoki	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	15/06/2016 10:52:46	Valeria Aoki	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.633.103

SAO PAULO, 12 de Julho de 2016

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

9 REFERÊNCIAS

1. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17026.
2. Aoki V, Fukumori LMI, Freitas EL, Sousa JX, Jr., Perigo AM, Oliveira ZNP. Direct and indirect immunofluorescence. *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 2010;85(4):490-9.
3. Arbache ST, Delgado L, Aoki V, Nogueira TG, Miyamoto D. Immunofluorescence testing in the diagnosis of autoimmune blistering diseases: overview of 10-year experience. *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 2014;89(6):885-9.
4. Bystryń JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet*. 2005;366(9479):61-73.
5. Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol*. 2011;29(4):432-6.
6. James KA, Culton DA, Diaz LA. Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin*. 2011;29(3):405-12, viii.
7. Aoki V, Rivitti EA, Ito LM, Hans-Filho G, Diaz LA. Perfil histórico da imunopatogenia do pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem). *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2005;80(3):287-92.
8. Altun E, Yaylı S, Selçuk LB, Arıca DA, Bahadır S. Clinical and Demographic Characteristics of Pemphigus Vulgaris Patients. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2018;26(2):119-25.
9. Walter E, Vielmuth F, Wanuske MT, Seifert M, Pollmann R, Eming R, et al. Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. *Front Immunol*. 2019;10:1128.
10. Drobnitsch I, Zombai E, Schneider I. [Pemphigus herpetiformis]. *Z Hautkr*. 1990;65(10):911-3.
11. Duarte IB, Bastazini I, Barreto JA, Carvalho CV, Nunes AJ. Pemphigus herpetiformis in childhood. *Pediatr Dermatol*. 2010;27(5):488-91.
12. Ruocco V, Ruocco E, Caccavale S, Gambardella A, Lo Schiavo A. Pemphigus vegetans of the folds (intertriginous areas). *Clin Dermatol*. 2015;33(4):471-6.
13. Chorzelski TP, Beutner EH, Kowalewski C, Olszewska M, Maciejowska E, Seferowicz E, et al. IgA pemphigus foliaceus with a clinical presentation of pemphigus herpetiformis. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24(5 Pt 2):839-44.
14. Santi CG, Flores RS, Medina MM, Maruta CW, Aoki V, Anhalt G, et al. Paraneoplastic pemphigus associated with pelvic inflammatory fibrosarcoma: a case report. *J Dermatol*. 2005;32(12):1014-20.
15. Moreno ACL, Santi CG, Gabbi TVB, Aoki V, Hashimoto T, Maruta CW. IgA pemphigus: Case series with emphasis on therapeutic response. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2014;70(1):200-1.

16. Santi CG, Maruta CW, Aoki V, Sotto MN, Rivitti EA, Diaz LA. Pemphigus herpetiformis is a rare clinical expression of nonendemic pemphigus foliaceus, fogo selvagem, and pemphigus vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996;34(1):40-6.
17. Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Chorzelska J. Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. *Int J Dermatol*. 1975;14(5):353-9.
18. WINKELMANN RK, ROTH HL. Dermatitis herpetiformis with acantholysis or pemphigus with response to sulfonamides: report of two cases. *Arch Dermatol*. 1960;82:385-90.
19. Sneddon I, Church R. Pemphigus foliaceus presenting as dermatitis herpetiformis. *Acta Derm Venereol*. 1967;47(6):440-6.
20. Connor B. Herpetiform pemphigus foliaceus responsive to dapsone. *Br J Dermatol*. 1972;86(1):99-101.
21. DeMento FJ, Grover RW. Acantholytic herpetiform dermatitis. *Arch Dermatol*. 1973;107(6):883-7.
22. Barranco VP. Mixed bullous disease. *Arch Dermatol*. 1974;110(2):221-4.
23. Emmerson RW, Wilson-Jones E. Eosinophilic spongiosis in pemphigus. A report of an unusual histological change in pemphigus. *Arch Dermatol*. 1968;97(3):252-7.
24. Maciejowska E, Jablonska S, Chorzelski T. Is pemphigus herpetiformis an entity? *Int J Dermatol*. 1987;26(9):571-7.
25. Ingber A, Feuerman EJ. Pemphigus with characteristics of dermatitis herpetiformis. A long-term follow-up of five patients. *Int J Dermatol*. 1986;25(9):575-9.
26. Laws PM, Heelan K, Al-Mohammed F, Walsh S, Shear NH. Pemphigus herpetiformis: a case series and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2015;54(9):1014-22.
27. Morini JP, Jomaa B, Gorgi Y, Saguem MH, Nouira R, Roujeau JC, et al. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. *Arch Dermatol*. 1993;129(1):69-73.
28. Durdu M, Seçkin D. Pemphigus herpetiformis: six additional cases with an emphasis on eczema-like features and the diagnostic utility of Tzanck smears. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(3):540-2.
29. Costa LMC, Cappel MA, Keeling JH. Clinical, pathologic, and immunologic features of pemphigus herpetiformis: a literature review and proposed diagnostic criteria. *Int J Dermatol*. 2019.
30. Jerbi A, Hachicha H, Feki S, Bahloul E, Sellami K, Abida O, et al. Pemphigus herpetiformis in South Tunisia: a clinical expression of pemphigus foliaceus? *Int J Dermatol*. 2018;57(9):1094-101.
31. Proença NG, Ribeiro AG. [Epidemiologic aspects of the Brazilian pemphigus foliaceus. Preliminary results]. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1976;22(8):281-4.
32. Maciejowska E, Jablonska S, Chorzelski T. IS PEMPHIGUS HERPETIFORMIS AN ENTITY. *International Journal of Dermatology*. 1987;26(9):571-7.
33. Weber L. [Pemphigus herpetiformis]. *Hautarzt*. 1984;35(6):316-8.
34. Leithauser LA, Mutasim DF. A case of pemphigus herpetiformis occurring in a 9-year-old boy. *Pediatr Dermatol*. 2013;30(6):760-2.

35. Hocar O, Ait Sab I, Akhdari N, Hakkou M, Amal S. A case of pemphigus herpetiformis in a 12-year-old male. *ISRN Pediatr*. 2011;2011:712560.
36. Moutran R, Maatouk I, Stephan F, Halaby E, Abadjian G, Tomb R. Letter: Pemphigus herpetiformis of age of onset at 6 years. *Dermatol Online J*. 2011;17(6):10.
37. Akoglu G, Yavuz SO. Pemphigus herpetiformis-type drug reaction caused by erdosteine containing mucolytic in a child. *Cutan Ocul Toxicol*. 2017;36(3):302-4.
38. Peterman CM, Vadeboncoeur S, Schmidt BA, Gellis SE. Pediatric Pemphigus Herpetiformis: Case Report and Review of the Literature. *Pediatr Dermatol*. 2017;34(3):342-6.
39. Maggiore R, Viglizzo G, Occella C, Bleidl D, Coccia MC, Manunza F. Pemphigus herpetiformis resistant to first line therapy: a rare case in childhood. *G Ital Dermatol Venereol*. 2018.
40. Evans MS, Culton DA, Diaz LA, Googe PB, Morrell DS. Childhood pemphigus foliaceus presenting as a polycyclic eruption: Case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol*. 2019;36(2):236-41.
41. Kasperkiewicz M, Kowalewski C, Jabłońska S. Pemphigus herpetiformis: from first description until now. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(4):780-7.
42. Tateishi C, Tsuruta D, Nakanishi T, Uehara S, Kobayashi H, Ishii M, et al. Antidesmocollin-1 antibody-positive, antidesmoglein antibody-negative pemphigus herpetiformis. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(1):e8-10.
43. Bauer R, Stadler R, Immel C, Orfanos CE. [Acantholysis and eosinophilic spongiosis: pemphigus herpetiformis. Successful retinoid therapy]. *Hautarzt*. 1983;34(1):13-7.
44. Morais KL, Miyamoto D, Maruta CW, Aoki V. Diagnostic approach of eosinophilic spongiosis. *An Bras Dermatol*. 2019;94(6):724-8.
45. Aoki V, Sousa JX, Fukumori LM, Périgo AM, Freitas EL, Oliveira ZN. Direct and indirect immunofluorescence. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):490-500.
46. Porro AM, Caetano LeV, Maehara LeS, Enokihara MM. Non-classical forms of pemphigus: pemphigus herpetiformis, IgA pemphigus, paraneoplastic pemphigus and IgG/IgA pemphigus. *An Bras Dermatol*. 2014;89(1):96-106.
47. Lebeau S, Müller R, Masouyé I, Hertl M, Borradori L. Pemphigus herpetiformis: analysis of the autoantibody profile during the disease course with changes in the clinical phenotype. *Clin Exp Dermatol*. 2010;35(4):366-72.
48. O'Toole EA, Mak LL, Guitart J, Woodley DT, Hashimoto T, Amagai M, et al. Induction of keratinocyte IL-8 expression and secretion by IgG autoantibodies as a novel mechanism of epidermal neutrophil recruitment in a pemphigus variant. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(1):217-24.
49. Sitaru C, Mihai S, Zillikens D. The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(1):1-8.
50. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai A, Nagata Y, Strasz Z, et al. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(1):117-22.

51. Tay YE, Lee SSJ, Lim YL. Pemphigus herpetiformis with autoantibodies to desmocolins 1, 2 and 3. *Clin Exp Dermatol*. 2018;43(3):360-2.
52. Durdu M, Baba M, Seçkin D. The value of Tzanck smear test in diagnosis of erosive, vesicular, bullous, and pustular skin lesions. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(6):958-64.
53. Kasperkiewicz M. Diagnostic criteria for pemphigus herpetiformis. *Int J Dermatol*. 2019;58(11):e216-e7.
54. Faria PCP, Cruz CC, Abulafia LA, Maceira JMP, Cassia FF, Medeiros PM. The importance of direct immunofluorescence in pemphigus herpetiformis diagnosis. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5 Suppl 1):145-7.
55. Atzmony L, Hodak E, Gdalevich M, Rosenbaum O, Mimouni D. Treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Dermatol*. 2014;15(6):503-15.
56. Gürcan HM, Ahmed AR. Efficacy of dapsone in the treatment of pemphigus and pemphigoid: analysis of current data. *Am J Clin Dermatol*. 2009;10(6):383-96.
57. Hymes SR, Jordon RE. Pemphigus foliaceus. Use of antimalarial agents as adjuvant therapy. *Arch Dermatol*. 1992;128(11):1462-4.
58. Huang A, Madan RK, Levitt J. Future therapies for pemphigus vulgaris: Rituximab and beyond. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(4):746-53.
59. de Sena Nogueira Maehara L, Huizinga J, Jonkman MF. Rituximab therapy in pemphigus foliaceus: report of 12 cases and review of recent literature. *Br J Dermatol*. 2015;172(5):1420-3.
60. Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS. The new pemphigus variants. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999;40(5):649-71.
61. Ingber A, Feuerman EJ. [Pemphigus herpetiformis--a new variant of pemphigus disease]. *Harefuah*. 1981;100(3):145-6.
62. Seitz CS, Staegemeir E, Amagai M, Rose C, Bröcker EB, Zillikens D. Pemphigus herpetiformis with an autoimmune response to recombinant desmoglein 1. *Br J Dermatol*. 1999;141(2):354-5.
63. Durham A, Carlos CA, Gudjonsson JE, Lowe L, Hristov AC. Pemphigus herpetiformis: report of a rare case. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(5):e231-3.
64. Wosnitza M, Blazek C, Megahed M. Pemphigus herpetiformis. *Hautarzt*. 2008;59(6):459-60.
65. Matsukura S, Takahashi K, Hirokado M, Ikezawa Y, Nakamura K, Fukuda S, et al. Recalcitrant pemphigus herpetiformis with high titer of immunoglobulin G antibody to desmoglein 1 and positive IgG antibody to desmocolin 3, elevating thymus and activation-regulated chemokine. *Int J Dermatol*. 2014;53(8):1023-6.
66. Green KJ, Gaudry CA. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(3):208-16.
67. Seshadri D, Kumaran MS, Kanwar AJ. Acantholysis revisited: back to basics. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2013;79(1):120-6.
68. Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, Yokouchi M, Amagai M, Shiraishi K, et al. Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. *J Dermatol Sci*. 2017;85(3):197-207.

69. Grando SA. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity*. 2012;45(1):7-35.
70. Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med*. 1989;320(22):1463-9.
71. Heupel WM, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol*. 2008;181(3):1825-34.
72. Carew B, Wagner G. Cutaneous pemphigus vulgaris with absence of desmoglein 1 autoantibodies. An example of the extended desmoglein compensation theory. *Australas J Dermatol*. 2014;55(4):292-5.
73. Hans-Filho G, Aoki V, Bittner NRH, Bittner GC. Fogo selvagem: endemic pemphigus foliaceus. *An Bras Dermatol*. 2018;93(5):638-50.
74. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest*. 1999;103(4):461-8.
75. Ishii K, Amagai M, Komai A, Ebihara T, Chorzelski TP, Jablonska S, et al. Desmoglein 1 and desmoglein 3 are the target autoantigens in herpetiform pemphigus. *Arch Dermatol*. 1999;135(8):943-7.
76. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai A, Nagata Y, Strasz Z, et al. Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;48(1):117-22.
77. Ohata C, Higashi Y, Yamagami J, Koga H, Ishii N, Kanekura T, et al. Coexistence of pemphigus herpetiformis with IgG antibodies to desmocollin 1 and pemphigoid with IgG antibodies to BP180 C-terminal domain and laminin γ 2. *JAMA Dermatol*. 2013;149(4):502-4.
78. Bolognia JL, Jorizzo JL, Schaffer JV. *Dermatology*. 3^a ed. Philadelphia:2012.
79. Prado R, Brice SL, Fukuda S, Hashimoto T, Fujita M. Paraneoplastic pemphigus herpetiformis with IgG antibodies to desmoglein 3 and without mucosal lesions. *Arch Dermatol*. 2011;147(1):67-71.
80. Ohyama B, Nishifuji K, Chan PT, Kawaguchi A, Yamashita T, Ishii N, et al. Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large-scale longitudinal study using desmoglein 2-based swapped molecules. *J Invest Dermatol*. 2012;132(4):1158-68.
81. Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. Pemphigoid diseases: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Autoimmunity*. 2012;45(1):55-70.
82. Kasperkiewicz M, Nimmerjahn F, Wende S, Hirose M, Iwata H, Jonkman MF, et al. Genetic identification and functional validation of Fc γ RIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol*. 2012;228(1):8-19.
83. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(8):622-34.
84. Spindler V, Heupel WM, Efthymiadis A, Schmidt E, Eming R, Rankl C, et al. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem*. 2009;284(44):30556-64.

85. Chen J, Den Z, Koch PJ. Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 17):2844-9.
86. Ishiura N, Tamura-Nakano M, Okochi H, Tateishi C, Maki M, Shimoda Y, et al. Herpetiform pemphigus with characteristic transmission electron microscopic findings of various-sized ballooning vacuoles in keratinocytes without acantholysis. *Br J Dermatol.* 2019;180(1):187-92.
87. Sabat R, Wolk K, Loyal L, Döcke WD, Ghoreschi K. T cell pathology in skin inflammation. *Semin Immunopathol.* 2019;41(3):359-77.
88. Doutre MS. [Cutaneous immune system]. *Ann Dermatol Venereol.* 2009;136 Suppl 6:S257-62.
89. Abbas A, Lichtman A, Pillais S. *Imunologia celular e molecular.* 7ª ed. Rio de Janeiro:2012.
90. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.
91. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinini MP, Rugiu FS, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148(7):2142-7.
92. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992;98(4):279-85.
93. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655-69.
94. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(5):651-7.
95. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8(6):639-46.
96. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3573-85.
97. Angkasekwinai P. Th9 Cells in Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(5):29.
98. Clark RA, Schlapbach C. Th9 cells in skin disorders. *Semin Immunopathol.* 2017;39(1):47-54.
99. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXCR5 chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000;192(11):1545-52.
100. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:531-64.
101. Auriemma M, Vianale G, Amerio P, Reale M. Cytokines and T cells in atopic dermatitis. *European cytokine network.* 2013;24(1):37-44.
102. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int.* 2013;62(2):151-61.

103. Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy*. 2013;68(8):974-82.
104. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1344-54.
105. Kulthanan K, Boochangkool K, Tuchinda P, Chularojanamontri L. Clinical features of the extrinsic and intrinsic types of adult-onset atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy*. 2011;1(2):80-6.
106. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev*. 2011;242(1):233-46.
107. Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DY. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4S):S65-S76.
108. Nattkemper LA, Martinez-Escala ME, Gelman AB, Singer EM, Rook AH, Guitart J, et al. Cutaneous T-Cell Lymphoma and Pruritus: the Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin. *Acta Derm Venereol*. 2016.
109. Singer EM, Shin DB, Nattkemper LA, Benoit BM, Klein RS, Didigu CA, et al. IL-31 is produced by the malignant T-cell population in cutaneous T-Cell lymphoma and correlates with CTCL pruritus. *J Invest Dermatol*. 2013;133(12):2783-5.
110. Sokołowska-Wojdyło M, Gleń J, Zabłotna M, Rębała K, Sikorska M, Florek A, et al. Association of distinct IL-31 polymorphisms with pruritus and severity of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(5):662-4.
111. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, et al. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):411-7.
112. Welz-Kubiak K, Kobuszezowska A, Reich A. IL-31 is overexpressed in lichen planus but its level does not correlate with pruritus severity. *J Immunol Res*. 2015;2015:854747.
113. Zhang Q, Putheti P, Zhou Q, Liu Q, Gao W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5-6):347-56.
114. Saleem MD, Oussedik E, D'Amber V, Feldman SR. Interleukin-31 pathway and its role in atopic dermatitis: a systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2017;28(7):591-9.
115. Kunsleben N, Rüdrieh U, Gehring M, Novak N, Kapp A, Raap U. IL-31 Induces Chemotaxis, Calcium Mobilization, Release of Reactive Oxygen Species, and CCL26 in Eosinophils, Which Are Capable to Release IL-31. *J Invest Dermatol*. 2015;135(7):1908-11.
116. Raap U, Gehring M, Kleiner S, Rüdrieh U, Eiz-Vesper B, Haas H, et al. Human basophils are a source of IL-31 and are differentially activated by IL-31. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(4):499-508.
117. Neis MM, Peters B, Dreuw A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, et al. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(4):930-7.

118. Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):448-60.
119. Feld M, Garcia R, Buddenkotte J, Katayama S, Lewis K, Muirhead G, et al. The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):500-8.e24.
120. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol*. 2004;5(7):752-60.
121. Hänel KH, Pfaff CM, Cornelissen C, Amann PM, Marquardt Y, Czaja K, et al. Control of the Physical and Antimicrobial Skin Barrier by an IL-31-IL-1 Signaling Network. *J Immunol*. 2016;196(8):3233-44.
122. Horejs-Hoeck J, Schwarz H, Lamprecht S, Maier E, Hainzl S, Schmittner M, et al. Dendritic cells activated by IFN- γ /STAT1 express IL-31 receptor and release proinflammatory mediators upon IL-31 treatment. *J Immunol*. 2012;188(11):5319-26.
123. Heise R, Neis MM, Marquardt Y, Joussen S, Heinrich PC, Merk HF, et al. IL-31 receptor alpha expression in epidermal keratinocytes is modulated by cell differentiation and interferon gamma. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):240-3.
124. Arai I, Tsuji M, Miyagawa K, Takeda H, Akiyama N, Saito S. Repeated administration of IL-31 upregulates IL-31 receptor A (IL-31RA) in dorsal root ganglia and causes severe itch-associated scratching behaviour in mice. *Exp Dermatol*. 2015;24(1):75-8.
125. Edukulla R, Singh B, Jegga AG, Sontake V, Dillon SR, Madala SK. Th2 Cytokines Augment IL-31/IL-31RA Interactions via STAT6-dependent IL-31RA Expression. *J Biol Chem*. 2015;290(21):13510-20.
126. Raap U, Weißmantel S, Gehring M, Eisenberg AM, Kapp A, Fölster-Holst R. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(3):285-8.
127. Nobbe S, Dziunycz P, Mühleisen B, Bilsborough J, Dillon SR, French LE, et al. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(1):24-8.
128. Rabenhorst A, Hartmann K. Interleukin-31: a novel diagnostic marker of allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(4):423.
129. Nattkemper LA, Martinez-Escala ME, Gelman AB, Singer EM, Rook AH, Guitart J, et al. Cutaneous T-cell Lymphoma and Pruritus: The Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(7):894-8.
130. Ohmatsu H, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Miyagaki T, Kai H, et al. Serum IL-31 levels are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(3):282-3.
131. Raap U, Wiczorek D, Gehring M, Pauls I, Ständer S, Kapp A, et al. Increased levels of serum IL-31 in chronic spontaneous urticaria. *Exp Dermatol*. 2010;19(5):464-6.
132. Hartmann K, Wagner N, Rabenhorst A, Pflanz L, Leja S, Förster A, et al. Serum IL-31 levels are increased in a subset of patients with mastocytosis and correlate with disease severity in adult patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):232-5.

133. Otsuka A, Tanioka M, Nakagawa Y, Honda T, Ikoma A, Miyachi Y, et al. Effects of cyclosporine on pruritus and serum IL-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2011;21(5):816-7.
134. Domingues R, de Carvalho GC, Oliveira LMdS, Taniguchi EF, Zimbres JM, Aoki V, et al. The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus. *British Journal of Dermatology*. 2015;172(1):48-55.
135. Gonzales AJ, Fleck TJ, Humphrey WR, Galvan BA, Aleo MM, Mahabir SP, et al. IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. *Vet Dermatol*. 2016;27(1):34-e10.
136. Kim S, Kim HJ, Yang HS, Kim E, Huh IS, Yang JM. IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol*. 2011;23(4):468-73.
137. Nygaard U, Hvid M, Johansen C, Buchner M, Fölster-Holst R, Deleuran M, et al. TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(11):1930-8.
138. Nakashima C, Otsuka A, Kabashima K. Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2018;27(4):327-31.
139. Kabashima K, Furue M, Hanifin JM, Pulka G, Wollenberg A, Galus R, et al. Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: Randomized, phase II, long-term extension study. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(4):1121-30.e7.
140. Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, et al. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*. 2017;376(9):826-35.
141. Bonciani D, Quintarelli L, Del Bianco E, Bianchi B, Caproni M. Serum levels and tissue expression of interleukin-31 in dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 2017;87(2):210-2.
142. Rüdrieh U, Gehring M, Papakonstantinou E, Illerhaus A, Engmann J, Kapp A, et al. Eosinophils are a Major Source of Interleukin-31 in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(8):766-71.
143. Reich A, Heisig M, Phan NQ, Taneda K, Takamori K, Takeuchi S, et al. Visual analogue scale: evaluation of the instrument for the assessment of pruritus. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(5):497-501.
144. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(6):1043-6.
145. Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res*. 2018;66(2):255-70.
146. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*. 2012;120(19):3882-90.
147. Amber KT, Valdebran M, Kridin K, Grando SA. The Role of Eosinophils in Bullous Pemphigoid: A Developing Model of Eosinophil Pathogenicity in Mucocutaneous Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:201.

148. Machado-Pinto J, McCalmont TH, Golitz LE. Eosinophilic and neutrophilic spongiosis: clues to the diagnosis of immunobullous diseases and other inflammatory disorders. *Semin Cutan Med Surg*. 1996;15(4):308-16.
149. Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci*. 1999;20(2):92-102.
150. Miura T, Kawakami Y, Oyama N, Ohtsuka M, Suzuki Y, Ohyama B, et al. A case of pemphigus herpetiformis with absence of antibodies to desmogleins 1 and 3. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(1):101-3.
151. Ansai O, Shimomura Y, Fujimoto A, Sakai A, Tsuchida Y, Hayashi R, et al. Case of pemphigus herpetiformis with immunoglobulin G autoantibodies against desmocollin-3. *J Dermatol*. 2017;44(1):104-5.
152. Hong WJ, Hashimoto T, Kim SC. A Case of Pemphigus Herpetiformis with Only Immunoglobulin G Anti-Desmocollin 3 Antibodies. *Ann Dermatol*. 2016;28(1):102-6.
153. On HR, Hashimoto T, Kim SC. Pemphigus herpetiformis with IgG autoantibodies to desmoglein 1 and desmocollin 1. *Br J Dermatol*. 2015;172(4):1144-6.
154. Rafei D, Müller R, Ishii N, Llamazares M, Hashimoto T, Hertl M, et al. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *Am J Pathol*. 2011;178(2):718-23.
155. Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):545-58.
156. Bilsborough J, Leung DY, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Boguniewicz M, et al. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):418-25.
157. Kasraie S, Niebuhr M, Werfel T. Interleukin (IL)-31 induces pro-inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins. *Allergy*. 2010;65(6):712-21.
158. Gangemi S, Quartuccio S, Casciaro M, Trapani G, Minciullo PL, Imbalzano E. Interleukin 31 and skin diseases: A systematic review. *Allergy Asthma Proc*. 2017;38(6):401-8.
159. Peng W, Novak N. Recent developments in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(5):417-22.
160. Malik K, Heitmiller KD, Czarnowicki T. An Update on the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin*. 2017;35(3):317-26.
161. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):677-87.
162. Lehman JS, Murrell DF, Camilleri MJ, Kalaaji AN. Infection and infection prevention in patients treated with immunosuppressive medications for autoimmune bullous disorders. *Dermatol Clin*. 2011;29(4):591-8.