José Vitor de Oliveira Júnior

**Perfil clínico e imunológico dos pênfigos
vulgar e foliáceo com envolvimento
umbilical**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valéria
Aoki

São Paulo

2012

José Vitor de Oliveira Júnior

**Perfil clínico e imunológico dos pênfigos
vulgar e foliáceo com envolvimento
umbilical**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valéria
Aoki

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Júnior, José Vitor de

Perfil clínico e imunológico dos pênfigos vulgar e
foliáceo com envolvimento umbilical / José Vitor de
Oliveira Júnior. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Valéria Aoki.

Descritores: 1.Pênfigo 2.Auto-anticorpos 3.Auto-
imunidade 4.Acantólise 5.Umbilical 6.Desmogleínas

USP/FM/DBD-316/12

Aos meus pais José Vitor e Alceni Maria cujas
mãos se fazem presentes em todos os meus
trabalhos. A minha esposa Luciana que
sempre manteve os olhos por cima de meus
ombros durante a produção deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha orientadora Prof^a Dr^a Valéria Aoki que foi minha maior fonte de inspiração e exemplo de profissional e de pessoa a ser seguida. Sem sua dedicação, paciência e sábias orientações eu não teria desenvolvido este trabalho. Obrigado por mostrar-me o valor da atividade acadêmica.

A minha esposa Luciana Coelho Sanches que me incentivou e me compreendeu nos momentos difíceis desta jornada. Muito obrigado pela paciência em suportar minhas ausências e pelo amor irrevogável.

Aos meus pais José Vitor de Oliveira e Alcení Maria de Oliveira e Oliveira. Por sempre me apoiarem para que eu pudesse trilhar os meus sonhos pelos melhores caminhos. Mestres na arte de ensinar a vida, aprendi que a ciência médica não se resume ao conhecimento. É necessário doação.

Ao meu núcleo familiar. Irmãos Ticiano Vitor, Karoline Bernadete, Bárbara e Thayná e sobrinha Flor. Por compreenderem a minha distância ao longo desta vida de dedicação.

Aos amigos César Maurício e Marco Túlio. Irmãos de espírito, que há mais de 15 anos comprazem comigo as suas amizades. Obrigado pelo ombro amigo e palavras de sabedoria e incentivo nos momentos difíceis. Me ensinaram o quanto vale um verdadeiro aperto de mão.

Aos biólogos do Laboratório de Imunologia do Departamento de Dermatologia Lígia M. F. Ichimura, e Alexandre M. Périgo pelas grandes contribuições e cooperações em relação à produção de dados para esta tese.

Agradeço também a todos os pacientes que participaram deste estudo, pela cooperação e a confiança depositada em nosso trabalho.

E a Deus. Obrigado por ser tão claro nos seus sinais e por me permitir enxergá-los. A ele devo a vida e a sustentação.

“Há um tempo em que é preciso
abandonar as roupas usadas,
que já tem a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos
que nos levam sempre aos mesmos lugares.

É o tempo da travessia:
E, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

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 FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Pênfigo Foliáceo (PF)	20
1.2 Pênfigo Vulgar (PV)	22
2. OBJETIVO	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Os Desmossomas e o Pênfigo	28
3.2 Diversidade dos Desmossomas nos Diferentes Tecidos	29
3.3 Regulação da Proliferação de Queratinócitos pelas Caderinas Desmossômicas	31
3.4 Vias de Sinalização nos Pênfigos	31
3.5 Embriologia e Anatomia da Região Umbilical	33
3.6 O Papel do HLA-G na Tolerância de Respostas Autoimunes	34
3.7 Expressão do LILR no Cordão Umbilical e Placenta Humana	36
4. MÉTODOS	39
4.1 Seleção dos Pacientes	40
4.2 Revisão dos Prontuários	42
4.3 Fotodocumentação Clínica	42

4.4 Imunofluorescência Indireta (IgG Total)	43
4.5 Introdução da Técnica de ELISA com Desmogleínas 1 e 3 Recombinantes	44
4.6 Imunofluorescência Direta (IFD)	45
5. RESULTADOS	47
5.1 Pênfigo Vulgar com Envolvimento Umbilical	48
5.2 Pênfigo Foliáceo com Envolvimento Umbilical	49
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	60
8. ANEXOS	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração esquemática representativa do modelo molecular dos desmossomas. As desmogleínas e desmocolinas estão ligadas às placas densas externas (ODP) e placas densas internas (IDP)	29
Figura 2.	Principais mecanismos de formação das bolhas no pênfigo. (a) interferência direta dos anticorpos na interação com as desmogleínas; (b) a ligação dos anticorpos ativam as vias de sinalização, resultando em perda da ligação das desmogleínas.	32
Figura 3.	Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com pênfigo vulgar com comprometimento umbilical	49
Figura 4.	Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com pênfigo foliáceo e comprometimento umbilical	50
Figura 5.	5A – 5F: Paciente #7 com eritema na região umbilical; 5B – Paciente #8 mostrando erosões e crostas na região umbilical; 5C – Paciente com pênfigo foliáceo exibindo erosões no tronco; 5D – Acantólise subcórnea (HE, X400); 5E-IFD: Presença de IgG com padrão intercelular intraepidérmico (X200).; 5F- IFI: IgG-anticorpos circulantes, 1:160 (X200)	53
Figura 6.	6A – Paciente exibindo erosões no lábio inferior; 6B – Bolhas, erosões e crostas na região anterior do tronco; 6C – Eritema e crostas na região umbilical; 6D – Pênfigo vulgar umbilical. Acantólise suprabasal e infiltrado inflamatório na derme. HE (x400); 6E-6F-IFD e IFI: Presença de IgG com padrão intercelular predominando nas camadas inferiores da epiderme (X200)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados Demográficos, Clínicos e Laboratoriais dos Pacientes com Pênfigo com Comprometimento Umbilical	51
-----------	---	----

RESUMO

Oliveira, JV Jr. Perfil clínico e imunológico dos pênfigos vulgar e foliáceo com envolvimento umbilical [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2012.

Introdução: Os pênfigos vulgar (PV) e foliáceo (PF) são dermatoses autoimunes vésico-bolhosas que apresentam anticorpos da classe IgG dirigidos contra desmogleínas 1 (Dsg) 1 e 3, cuja consequência é a clivagem intraepitelial (acantólise).

Objetivo: Caracterizar o perfil clínico e imunológico dos doentes de PF ou PV com envolvimento umbilical.

Métodos: Dez pacientes de pênfigo (vulgar ou foliáceo) com manifestação umbilical, acompanhados no Hospital das Clínicas, Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram analisados no período entre agosto de 2008 e janeiro de 2010, segundo suas características clínicas, histopatológicas e imunológicas (imunofluorescência direta, indireta e ELISA utilizando Dsg1 e Dsg3 recombinantes).

Resultados: Os dados demográficos identificaram que, dos 10 pacientes incluídos, sete eram mulheres, e três homens; a idade variou entre 24–70 anos, e a duração da enfermidade entre três e 16 anos. Cinco pacientes foram diagnosticados como PV e cinco como PF. Eritema, erosões, crostas e lesões vegetantes foram as características clínicas mais relevantes

presentes nas regiões umbilicais. A imunofluorescência direta (IFD) da região umbilical mostrou depósitos de IgG e C3 intercelulares intraepiteliais em oito doentes, e IgG isolada em dois indivíduos. A imunofluorescência indireta (IFI) com conjugado IgG mostrou padrão típico intercelular de pênfigo em todos os 10 pacientes, com títulos variando entre 1 : 160 e 1:2560. ELISA Dsg1 recombinante mostrou índices de 24 a 266 no PF, e de 0 a 270 no PV. A reatividade contra Dsg3 recombinante foi positiva em todos os pacientes com PV (ELISA 22–98), e mostrou-se negativa em todos os soros de PF. **Conclusões:** Todos os 10 pacientes com pênfigo com manifestação umbilical demonstraram perfil clínico e imunológico compatíveis com PF ou PV. Esta apresentação peculiar, ainda não bem elucidada, é raramente descrita na literatura. Uma possível explicação para esta apresentação distinta pode ser atribuída à presença de novos epítomos, ou uma associação com vestígios embrionários ou de cicatrização, localizados na região do cordão umbilical.

Descritores: 1.Pênfigo 2.Auto-anticorpos 3.Autoimunidade 4.Acantólise 5.Umbilical 6.Desmogleína

ABSTRACT

Oliveira, JV Jr. Clinical and immunological profile of umbilical involvement in pemphigus vulgaris and foliaceus [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2012.

Background: Pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF) are autoimmune vesicobullous disorders with IgG autoantibodies directed against desmoglein (Dsg)1 and 3, which lead to intraepidermal acantholysis.

Aim: To characterize the clinical and immunological profile of patients with PF or PV with umbilical involvement.

Methods: Ten patients from the Outpatient Clinic, Hospital das Clínicas, Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, diagnosed with either PV (n = 5) or mucocutaneous PF (n = 5) with umbilical lesions were assessed according to their clinical features, histopathology and immunological findings [direct and indirect immunofluorescence (DIF and IIF) and ELISA with recombinant Dsg1 and Dsg3]. Patients were evaluated from August 2008 to January 2010.

Results: Demographic data showed that from 10 patients, seven were women, and three men; age ranged from 24 to 70 years-old, disease duration was from 3 to 16 years). Erythema, erosions, crusts and vegetating skin lesions were the main clinical features of the umbilical region. DIF of the umbilical lesion gave positive results for intercellular epidermal IgG and C3 deposits in eight patients and for IgG alone in the other two. Indirect

immunofluorescence with IgG conjugate showing the typical pemphigus pattern was positive in all 10 patients, with titres varying from 1: 160 to 1:2560. ELISA with recombinant Dsg1 gave scores of 24–266 in PF and 0–270 in PV. Reactivity to recombinant Dsg3 was positive in all five patients with PV (ELISA 22–98) and was negative in all PF sera.

Conclusions: All 10 patients diagnosed as pemphigus with umbilical presentation had the clinical and immunopathological features of either PF or PV. This peculiar presentation, not yet completely elucidated, has been rarely reported in the literature. A possible explanation for this unique presentation may be the presence of either novel epitopes or an association with embryonic or scar tissue located in the umbilical-cord region.

Descriptors: 1.Pemphigus 2.Autoantibodies 3.Autoimmunity 4.Acantholysis 5.Umbilical 6.Desmoglein.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

Os pênfigos são um grupo de doenças bolhosas auto-imunes as quais se caracterizam pela formação de uma bolha intraepidérmica, em decorrência do reconhecimento de auto-antígenos por autoanticorpos em geral da classe IgG^{1,2}. As duas principais formas de pênfigo são o pênfigo vulgar (PV), de pior prognóstico, que pode acometer pele e/ou mucosas, e o pênfigo foliáceo, que possui envolvimento exclusivamente cutâneo ^{2,3,4}. A incidência dos pênfigos na população geral varia entre 0.75 e 5 casos por cada milhão em humanos, podendo também ser encontrada em outros mamíferos (cavalos, cachorros e gatos)².

Os pênfigos afetam igualmente homens e mulheres entre a quarta e a sexta décadas de vida e apresentam distribuição universal. No pênfigo vulgar, existem duas formas principais de manifestação da doença: a forma exclusivamente mucosa (PVM), e a muco-cutânea (PVMC).^{2,3} A doença inicia-se mais comumente como erosões não cicatriciais, dolorosas, nas mucosas oral, laríngea, esofágica, nasal e/ou vaginal. Tardamente, bolhas flácidas podem surgir no couro cabeludo, tronco, região inguinal e axilar, que se rompem facilmente deixando grandes áreas erodidas. Ao contrário do pênfigo vulgar, o pênfigo foliáceo afeta somente a pele, manifestando-se como bolhas flácidas, e podendo se estender para a face, couro cabeludo e tronco.⁵

Formas especiais de pênfigo incluem: os induzidos por drogas (penicilamina, penicilina, captopril e betabloqueadores), como manifestação

paraneoplásica de alguns linfomas e carcinomas, o pênfigo por IgA e o pênfigo herpetiforme (este uma variante clínica do PV ou PF) ⁵. No caso do pênfigo foliáceo, existe uma forma endêmica em certas regiões da América Latina, em especial no Brasil, possivelmente vetor-mediada e denominada de fogo selvagem ^{6,7}.

Além do fenótipo clínico, o diagnóstico dos pênfigos é baseado no perfil histopatológico e imunológico do paciente. A característica histopatológica mais marcante neste grupo de doenças é a acantólise, ou perda da adesão entre um queratinócito e outro, com perda da sua arquitetura normal. No pênfigo vulgar, o plano de clivagem está localizado na porção inferior da epiderme, usualmente acima da camada basal. Ao contrário, no pênfigo foliáceo, o plano de clivagem se localiza na altura da camada granulosa. As bolhas podem surgir em função do atrito ou aparecer na pele perilesional, um fenômeno conhecido como sinal de Nikolsky. ^{2,5}

Em todas as formas de pênfigo, autoanticorpos IgG são encontrados *in vivo* em padrão característico em torno da membrana plasmática do epitélio afetado, e são detectados no soro dos doentes. Cada forma de pênfigo é caracterizada por autoanticorpos específicos direcionados contra estruturas protéicas epiteliais.⁸ Nos pênfigos vulgar e foliáceo, os antígenos são expressos somente no epitélio escamoso estratificado. No pênfigo paraneoplásico, os antígenos são encontrados em diversos epitélios⁸.

Nos pênfigos, os autoanticorpos são suficientes para provocarem bolhas na pele humana *in vivo* e *in vitro*⁹. Ao contrário de outras doenças bolhosas auto-imunes como o penfigóide bolhoso e a epidermólise bolhosa

adquirida¹⁰, os anticorpos nos pênficos não necessitam do sistema complemento ou leucócitos para induzir bolhas *in vivo*. Pacientes com pênfico vulgar na forma predominantemente mucosa têm anticorpos dirigidos contra a desmogleína 3, mas não contra a desmogleína 1, enquanto na forma mucocutânea há anticorpos contra ambas as desmogleínas 1 e 3. No pênfico foliáceo, os anticorpos da classe IgG estão geralmente dirigidos contra desmogleína 1, mas não contra a desmogleína 3¹¹.

1.1 Pênfigo Foliáceo (PF)

O PF é uma dermatose bolhosa autoimune, que revela autoanticorpos que reconhecem a Dsg1. Existem duas formas principais, a descrita por Cazenave em 1850 (forma clássica), e a forma endêmica (fogo selvagem).⁶⁻⁸

O pênfico foliáceo endêmico ou fogo selvagem apresenta quadro clínico, histológico e imunológico similar à forma clássica, mas se diferencia especialmente por sua epidemiologia peculiar^{12,13}.

Sua ocorrência endêmica em áreas rurais da América do Sul sugere que um possível vetor hematófago possa estar envolvido na patogênese da doença. Existe uma frequência aumentada de HLA D1, DQ1 e DR4 e menor ocorrência de HLA DR3, DQ2 e DR7. Alguns dados sugerem que os haplótipos HLA DR7 e DQW2 possam conferir resistência ao desenvolvimento de pênfico foliáceo^{12, 13}.

Existem algumas variantes clínicas relacionadas ao PF. No pênfigo eritematoso, os achados de PF podem coexistir com achados clínicos e imunológicos de lúpus eritematoso. Drogas também podem induzir quadro PF-símile. Os agentes que induzem pênfigo são frequentemente drogas com alta reatividade aos grupos sulfidril, como a penicilamina e o captopril. Essas drogas podem induzir acantólise diretamente *in vitro*, na ausência de autoanticorpos, ou mais comumente podem desencadear doença mediada por auto-anticorpos *in vivo*, que persistem mesmo após a retirada da droga envolvida.

No pênfigo foliáceo a bolha formada é intramalphighiana alta. O exame microscópico de uma lesão recente revela perda de adesão entre membranas justapostas das células epidérmicas adjacentes através das organelas de adesão - os desmossomas^{14,15}. As células assumem um aspecto arredondado, sem nenhum contato célula-célula, conhecido na microscopia eletrônica como acantólise¹⁶.

Ao contrário do pênfigo vulgar, não há lesões mucosas mesmo quando a imunofluorescência demonstra autoanticorpos na mucosa oral *in vivo*⁸. A imunofluorescência direta (IFD) da pele perilesional demonstra depósitos de IgG e/ ou C3 intercelular na porção superior do estrato de Malpighi¹⁷.

O soro de pacientes com pênfigo foliáceo reconhece a desmogleína 1, uma glicoproteína transmembranosa de 160-kDa^{8,12,14}. A Dsg1 é uma caderina e difere das outras caderinas pela presença de um longo domínio citoplasmático. Este domínio pode mediar sua interação com a

placoglobina, e outras proteínas intracelulares, que ligam a superfície celular com o citoesqueleto de queratina da célula¹². Este é um mecanismo que permite uma cadeia contínua de substâncias proteicas, fornecendo força e resistência ao estresse mecânico contínuo ao qual nossas superfícies cutâneas e mucosas são constantemente submetidas.

1.2 Pênfigo Vulgar (PV)

O pênfigo vulgar é uma doença autoimune adquirida, na qual anticorpos da classe IgG atuam contra proteínas desmossômicas-alvo, produzindo bolhas mucocutâneas. A desmogleína 3 é o maior antígeno alvo do pênfigo vulgar, uma glicoproteína de 130kDa que se liga à placoglobina, proteína da família das caderinas. Em 50% a 60% dos casos, especialmente no PV muco-cutâneo, há anticorpos adicionais contra a desmogleína 1, o antígeno alvo do pênfigo foliáceo¹⁸. O autoanticorpo envolvido é o maior determinante do fenótipo no pênfigo vulgar.^{19,20}

Até o advento da corticoterapia em 1950, a mortalidade no pênfigo vulgar atingia cerca de 75%. Estudos mostram que o fenótipo com predomínio de lesão predominantemente mucosa apresenta menor mortalidade (1%-17%), quando comparado com a forma cutâneo-mucosa (34% a 42%)²¹.

O diagnóstico de pênfigo vulgar deve ser suspeitado em qualquer paciente com erosões muco-cutâneas ou bolhas. A mucosa oral é o primeiro

local de envolvimento ao redor de 60 a 70% dos casos, e o pênfigo vulgar pode permanecer confinado nas superfícies mucosas ou se estender para a pele. Quando isto ocorre, acomete couro cabeludo, áreas intertriginosas como axilas e região inguinal. As bolhas são flácidas rompendo-se facilmente dando lugar a erosões.^{8,12} Existe uma forma de melhor prognóstico, que se apresenta como pênfigo vegetante. Por vezes, o PV pode se mostrar como a variante herpetiforme, ou droga-induzido⁸.

Uma biópsia da pele ou mucosa oral pode ser realizada para elucidação diagnóstica. Procede-se então o exame histopatológico, que revela acantólise suprabasal, sugestivo de pênfigo vulgar, mas o diagnóstico definitivo deve ser confirmado através do depósito de IgG intercelular intraepitelial por IFD⁸. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assays*) é o exame de escolha para a dosagem direta de anticorpos anti-desmogleína 1 e 3. Em 1994, em um estudo realizado por CHRYSSOMALLIS *et al.*, mostrou-se que a sensibilidade da biópsia da mucosa oral foi de 71% enquanto na biópsia de pele normal foi de 61% em 28 pacientes avaliados com pênfigo vulgar oral²². Um outro estudo realizado em 1999 por SWLLY *et al.* evidenciou que a sensibilidade da imunofluorescência direta na mucosa oral foi de 89% comparado com a imunofluorescência indireta que mostrou sensibilidade de 85%²³. A imunofluorescência direta mostra acúmulos de IgG e C3 intercelular na porção média e inferior ou até em toda epiderme da pele perilesional ou mucosa¹⁷. Pacientes com doença ativa apresentam altos títulos de IgG4 sérica, enquanto a IgG1 se relaciona à remissão ou fase pré-clínica, à semelhança do que ocorre no pênfigo foliáceo²⁴.

Este estudo foi desenvolvido a partir da observação de, apesar de raro, pacientes com diagnóstico de pênfigo (vulgar ou foliáceo) podem apresentar lesões umbilicais durante o curso da doença. Estas lesões fazem diagnóstico diferencial com outras dermatoses, e podem passar despercebidas. A revisão da literatura certifica a escassez de pacientes de pênfigo vulgar ou foliáceo descritos com comprometimento umbilical.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Este estudo visou avaliar o perfil clínico e imunológico dos pênfigos vulgar e foliáceo com comprometimento da região umbilical, em pacientes acompanhados no ambulatório de dermatoses bolhosas auto-imunes do Hospital das Clínicas do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os Desmossomas e o Pênfigo

Os desmossomas foram descritos pela primeira vez em 1864 por um patologista italiano, Bizzozero. Todavia, o termo desmossoma foi cunhado pela primeira vez pelo anatomista austríaco Josef Schaffer, tendo combinado as palavras gregas “desmos” (ligação) e “soma” (corpo).

O termo pênfigo deriva da palavra grega “pemphix” (bolha), e é utilizado na dermatologia desde 1791, antes mesmo do pênfigo ser associado a produção de autoanticorpos contra antígenos dos queratinócitos²⁵.

Os desmossomas são estruturas juncionais discóides com diâmetro variando entre 0.2 e 0.5 μm , sendo compostos por duas placas eletro densas, separados por um espaço de 24 a 30 nanômetros (nm). Ligados a estas placas, e atravessando o espaço entre elas encontram-se os filamentos intermediários. Estes desmossomas são formados por estruturas pertencentes a três famílias diferentes de glicoproteínas. As desmogleínas (Dsg), as quais interagem com as desmoplaquinas (DP) e placoglobinas (PG), fazem parte da família das caderinas, e são os antígenos-alvo nos pênfigos. As proteínas da família das caderinas, são as desmogleínas 1 a 4

e as desmocollinas (Dsc) 1 a 3, e caracterizam-se por serem glicoproteínas transmembranas cálcio-dependentes²⁶.

Os genes que codificam as caderinas desmossômicas localizam-se no cromossomo 18. Estudos mostram a importância da desmogleína 2 e da desmocolina 3 no desenvolvimento embrionário, uma vez que a deficiência destas glicoproteínas durante esta fase implicam em letalidade fetal. Assim, acredita-se que estas glicoproteínas possuam função “sinalizadora” durante a vida embrionária além da atividade de adesão²⁷.

Figura 1. Ilustração esquemática representativa do modelo molecular dos desmossomos. As desmogleínas e desmocollinas estão ligadas às placas densas externas (ODP) e placas densas internas (IDP).

Adaptado de Waschke J, histochem Cell Biol. 2008; 130:21-54⁵⁷

3.2 Diversidade dos Desmossomas nos Diferentes Tecidos

Os desmossomas não são identificados em todos os tecidos e células, e apresentam expressão distinta nos diferentes epitélios. Esta diversidade possui implicações na diferenciação tecidual, sendo importante no desenvolvimento de doenças genéticas, e na resposta autoimune contra componentes específicos destes desmossomos²⁸.

Alguns componentes desmossômicos tais como Dsg2, Dsc2, desmoplaquina, placoglobina e placofilina 2 são universalmente expressos em todas as células e tecidos nos quais os desmossomas são encontrados. A placofilina 3 está presente em todos os tecidos, excetuando-se os hepatócitos. O epitélio urotelial expressa apenas Dsg2 e Dsc3. A Dsg1 encontra-se presente na mucosa uterina, estômago, intestino, fígado, pâncreas, enquanto a Dsc3 é expressa no urotélio, próstata e glândulas salivares²⁸.

Os pares Dsg1/Dsc1 são predominantes na epiderme superficial, enquanto as Dsg3/Dsc3 predominam nas camadas inferiores do epitélio. É importante notar que a diferente expressão tecidual nos epitélios estratificados contribui de maneira significativa para a diferenciação e função tecidual. Um estudo realizado em 2001 por ELIAS *et al.* mostrou que a expressão aumentada de Dsg3 na epiderme suprabasal resulta em hiperproliferação e alterações teciduais, levando à letalidade perinatal por perda de água através da pele²⁹. Da mesma forma, a super-expressão de Dsg2 e Dsc3 resulta em hiperproliferação cutânea, com a formação de papilomas, por alteração na via de sinalização das β -cateninas em ratos³⁰.

3.3 Regulação da Proliferação de Queratinócitos pelas Caderinas Desmossômicas

Estudos mostram que as caderinas desmossômicas tais como a Dsg3 regulam a proliferação de queratinócitos³¹. Autoanticorpos produzidos no pênfigo vulgar induzem proliferação contínua de queratinócitos, por prejudicarem a interação entre a Dsg3 e a placoglobina. Em função desta alteração, ocorre aumento da expressão do gene c-Myc³². Segundo esta teoria, a Dsg3 ligada à epiderme não afetada inibe a enzima glicogênio quinase sintase (GSK) da via da quinase fostatidil inositol. Assim, a degradação da placoglobina é abolida, induzindo supressão do c-Myc dentro do núcleo, o que resulta em interrupção do crescimento do queratinócito³³. Ainda, a inibição da Dsg3 por autoanticorpos nos pênfigos induz à ativação de uma enzima da via da quinase fosfatidil inositol, liberando o gene c-Myc e resultando no surgimento de lesões vegetantes locais³³.

3.4 Vias de Sinalização nos Pênfigos

A acantólise é a marca registrada dos pênfigos. A clivagem proteolítica das moléculas de adesão respondem por esta característica. Os anticorpos IgG bloqueiam os inibidores das proteases, que degradam a interação entre as estruturas de junção³⁴. Além disto a atividade do fator

ativador do plasminogênio e a expressão do receptor ativador do plasminogênio uroquinase (uPAR) estão aumentados em indivíduos com pênfigo vulgar. Anticorpos anti uPAR foram suficientes para bloquear a acantólise induzida por IgG em PF ou PV em vários estudos³⁵. O sistema ativador do plasminogênio parece não ser essencial para o desenvolvimento do pênfigo, mas parece agravar o fenótipo quando mediadores inflamatórios secundários tais como o TNF- α e a IL-1 α são liberados.

O mesmo poderia ocorrer com outras proteases, tais como enzimas da família das metaloproteinases (MMP e ADAM). Em um estudo realizado por Cirillo *et al* em 2007, constatou-se que, em presença de IgG de PV, estas duas enzimas estão superexpressas. Todavia, ainda não há evidências suficientes que apontem que estas enzimas proteolíticas possam quebrar as desmogleínas³⁶.

Figura 2. Principais mecanismos de formação das bolhas no pênfigo. (a) interferência direta dos anticorpos na interação com as desmogleínas; (b) a ligação dos anticorpos ativaram as vias de sinalização resultando em perda da ligação das desmogleínas

Adaptado de Waschke J, histochem Cell Biol. 2008; 130:21-54 ⁵⁷

3.5 Embriologia e Anatomia da Região Umbilical

A placenta humana é formada por uma porção fetal e uma materna. A superfície materna é constituída de cotilédones e os sulcos ao seu redor. Cada cotilédone convexo consiste em várias vilosidades-tronco principais, com suas inúmeras vilosidades terminais. Os sulcos são ocupados pelos septos da placenta quando as partes materna e fetal da mesma estão unidas. Na superfície fetal os vasos correm pela placa coriônica, abaixo do âmnio e convergem para formar os vasos umbilicais no ponto de fixação do cordão umbilical ³⁷. O cordão, por sua vez, deriva do anel umbilical primitivo por volta da quinta semana de gestação ³⁸.

O cordão umbilical possui de 1 a 2 cm de diâmetro e de 30 a 90 cm de comprimento (média 55 cm). Esta estrutura é comumente formada por duas artérias e uma veia envolvidas por tecido conjuntivo mucóide (*Geléia de Wharton*). ³⁷ A *Geléia de Wharton* é rica em proteoglicanas e tem a função de proteger as camadas dos vasos sanguíneos ³⁸. A secção transversal de qualquer parte do cordão umbilical nos permite identificar as seguintes estruturas: uma veia, duas artérias e, próximo ao centro, um

pequeno ducto resultante da vesícula umbilical representado por uma linha formada de células epiteliais cubóides que se atrofia e desaparece e, quando persistente, dá origem ao divertículo de Merckel ³⁹. As artérias têm suas paredes formadas por uma camada muscular e muitas fibras elásticas, as quais contribuem para uma constrição rápida e contração dos vasos umbilicais depois que o cordão umbilical é cortado ³⁸. Como os vasos são mais compridos que o cordão, é comum a sua torção ou flexão ³⁷.

O cordão umbilical pode ser alvo de várias anormalidades durante a vida embrionária. Alterações do tamanho, artéria umbilical única, presença de quatro vasos fetais, alterações no ponto de inserção, inserção marginal, torções, nós, formação de cistos e hematomas, podendo resultar ou não em anormalidades fetais ³⁹.

3.6 O Papel do HLA-G na Tolerância de Respostas Autoimunes

Yari *et al* mostram a clara expressão de HLA-G na pele de pacientes com pênfigo vulgar⁴⁰. Este antígeno não polimórfico, pertencente ao sistema HLA classe I foi reconhecido na pele de indivíduos com pênfigo vulgar e sem pênfigo vulgar utilizando-se anticorpos monoclonais. Os anticorpos reconhecem tanto o HLA-G na isoforma solúvel, quanto ligado à membrana. O RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase *Real Time*) é utilizado para se avaliar os padrões de RNAm do HLA-G transcritos nas células

epidérmicas de indivíduos normais e com pênfigo vulgar. A expressão de HLA-G na forma transcricional pode ser encontrada somente na pele de indivíduos normais. **Todavia, células da epiderme provenientes de pacientes com pênfigo vulgar expressam tanto a forma transcricional ,quanto a translacional do HLA-G.** Além disso, a RT-PCR revela redução nos níveis de HLA-G2 e elevação nos níveis de HLA-G1 transcritos na pele dos pacientes com pênfigo vulgar, quando comparadas às células normais. Estas observações sustentam na literatura a relação entre o papel do HLA-G na indução de tolerância de respostas autoimunes individuais ⁴⁰.

Em grupos populacionais específicos, como os judeus Ashkenazi, a incidência de pênfigo vulgar está relacionada com a presença do HLA-G. Gazit *et al.* analisaram amostras de DNA obtidas de pacientes com pênfigo vulgar e mapearam áreas do sistema HLA classe I, que estão significativamente associadas à doença. Utilizando a técnica SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), áreas específicas dentro desta região são rastreadas. Neste estudo, um set de 26 marcadores SNP, o qual identifica uma região do cromossomo de cerca de 600.000 bp, foi utilizada para escanear amostras de DNA de pacientes com pênfigo vulgar e seus controles. Dos 26 marcadores SNP, quatro marcaram a região HLA-G. **Os resultados sugerem, portanto, que o HLA-G está associado com pênfigo vulgar em pacientes de origem Ashkenazi**⁴⁰.

3.7 Expressão do LILR no Cordão Umbilical e Placenta Humana

O HLA-G, uma molécula classe Ib do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) com múltiplas isoformas protéicas é fortemente expresso no citotrofoblasto (CTB), invadindo a decídua do endométrio do útero humano^{42,43}. **Estudos das funções do HLA-G mostram que suas isoformas atuam guiando a resposta imune para a imunossupressão⁴⁴.** A ligação a receptores de leucócitos imunoglobulina-like (LILR), os quais interferem com a ativação das células ligadas ao sistema imunológico, está implicada neste processo de imunomodulação.

Macrófagos derivados da porção materna da placenta expressam positividade para os receptores LILR (LILRB₁ e LILRB₂), sugerindo que o útero materno é um ambiente imunologicamente inerte em função da expressão local de HLA-G.

Os receptores LILRB₁ são encontrados em muitos tipos diferentes de leucócitos e os LILRB₂ são restritos às células da linhagem mielóide tais como monócitos, macrófagos e células dentríticas^{45,46}. Um estudo mais atual realizado por Manavalan *et al* mostrou também a expressão de LILRB₂ nas células endoteliais em biópsia de corações transplantados⁴⁷. Outro estudo recente mostrou que uma das isoformas do HLA-G (HLA-G5) foi relatado como alvo nas células endoteliais via CD160. A ligação resultou na inibição da proliferação de células endoteliais e sua invasão⁴⁸. Assim, o

HLA-G pode estar envolvido não somente na modulação da resposta imunológica como também na programação de outras linhagens celulares.

Um estudo realizado por Mc Intire *et al.*, testou o papel do HLA-G como regulador de receptores LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor*) na placenta humana e cordão umbilical. A placenta humana é fonte de citocinas e outras substâncias que regulam receptores celulares. Uma destas substâncias é o HLA-G, o qual influencia o funcionamento dos leucócitos e células endoteliais. Neste estudo, investigou-se a interação entre células dos tecidos extra-embrionários e os receptores regulados pela HLA-G. A análise de placentas a termo por imunohistoquímica e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) demonstrou que estas proteínas LILRB₁ e LILRB₂, assim como a mensagem específica que os controla, são produzidas nas vilosidades da placenta a termo, mas possuem localização diferente. LILRB₁ é encontrado em abundância nas células do estroma e LILRB₂ é encontrado predominantemente no tecido perivascular. Nenhum receptor foi encontrado no trofoblasto. Testes posteriores evidenciaram que há receptores LILRB₂ na musculatura da placenta mas não no endotélio. O cordão umbilical a termo exibe o mesmo padrão de LILRB₂, com este receptor sendo encontrado na musculatura lisa do cordão, porém não encontrado no endotélio. A presença de LILRB₁ nas células do estroma e LILRB₂ na musculatura lisa vascular sugere fortemente que o HLA-G tem uma função nova nestes tecidos, que poderia ser na regulação da imunidade placentária, assim como no desenvolvimento da vasculatura extraembrionária⁴¹.

Desta maneira, este novo papel do HLA-G na regulação da resposta leucocitária nos tecidos extra-embrionários, como placenta e cordão umbilical, e sua expressão na pele de pacientes com pênfigo vulgar são dados que poderiam se correlacionar, quando analisamos pacientes com pênfigo vulgar umbilical.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Seleção dos Pacientes

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo são pacientes com o diagnóstico de pênfigo vulgar ou pênfigo foliáceo com manifestação na região umbilical, acompanhados no ambulatório de Dermatoses Bolhosas do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP. O levantamento dos pacientes deu-se entre 1º de agosto de 2008 e 30 de janeiro de 2010.

A metodologia empregada foi a análise do diagnóstico, evolução clínica e sorologia dos doentes com pênfigo vulgar ou foliáceo, com lesões umbilicais através do quadro clínico, biópsia local, imunofluorescência direta e indireta e ELISA. Foram avaliados 10 pacientes com pênfigo vulgar ou foliáceo, sem grupo controle, cujo critério de inclusão foi o diagnóstico de pênfigo, com comprometimento cutâneo da região umbilical. A coleta de dados foi realizada através de uma ficha com informações acerca de dados epidemiológicos e clínicos.

Foram definidos como critérios de pênfigo vulgar os seguintes parâmetros:

- (1) presença de bolhas ou erosões mucosas ou mucocutâneas ou cutâneas com sinal de Nikolsky positivo;
- (2) clivagem suprabasal com acantólise;
- (3) IFD: depósito de auto-anticorpos com padrão intercelular para C3 e/ou IgG intraepiteliais;
- (4) IFI: presença de auto-anticorpos IgG circulantes de padrão intercelular, intraepiteliais utilizando como substrato o prepúcio humano
- (5) Autoanticorpos IgG que reconhecem Dsg1 e/ou Dsg3 através da técnica de ELISA com Dsg 1 e 3 recombinantes (valor do *cutt-off* = 20)^{49,50}.

Foram definidos como critérios de pênfigo foliáceo os seguintes parâmetros:

- (1) presença de erosões e/ou bolhas cutâneas com sinal de Nikolsky positivo;
- (2) clivagem subcórnea intraepidérmica com acantólise;
- (3) IFD: depósito de auto-anticorpos com padrão intercelular para C3 e/ou IgG intraepiteliais;
- (4) IFI: presença de auto-anticorpos IgG circulantes de padrão intercelular, intraepiteliais utilizando como substrato o prepúcio humano
- (5) Autoanticorpos IgG que reconhecem Dsg1 e/ou Dsg3 através da técnica de ELISA com Dsg 1 e 3 recombinantes (valor do *cutt-off* = 20)^{49,50}.

Durante o período de 15 meses foram encontrados 10 pacientes com diagnóstico de pênfigo vulgar ou pênfigo foliáceo no ambulatório de Dermatoses Bolhosas com comprometimento umbilical.

4.2 Revisão dos Prontuários

Após a seleção do paciente e a sua inclusão no protocolo do estudo, detalhada revisão do prontuário de cada um foi realizada. A partir dele foram extraídos dados relativos às características demográficas dos pacientes, tempo de diagnóstico do pênfigo, intercorrências e a evolução clínica da doença ao longo dos anos. Histórico da evolução laboratorial destes pacientes também foi levantado.

4.3 Fotodocumentação Clínica

Todos os pacientes com quadro de pênfigo e comprometimento da região umbilical eram encaminhados para a realização de fotografias digitais das lesões atuais, incluindo o detalhe da pele umbilical, a fim de se

documentar o perfil de lesão presente no momento da investigação naquela região. As fotos foram então armazenadas em um banco de imagens.

4.4 Imunofluorescência Indireta (IgG total)

1. Inicialmente coleta-se o soro dos pacientes com pênfigo vulgar ou pênfigo foliáceo sendo estocados a -70°C .
2. Os soros a serem testados são incubados em criocortes de 4 micra de epiderme de prepúcio humano por 30 minutos. Utilizou-se soro estocado ou novo de pacientes portadores de pênfigo vulgar ou foliáceo e soro de pacientes normais utilizados para a padronização do teste.
3. Duas lavagens (10 minutos cada) com TBS-Cálcio (*trizma buffered saline*) foram realizadas.
4. Incubação com anticorpo secundário (*goat anti-human IgG-FITC*, Sigma, USA), diluição 1:30.
5. Duas lavagens (10 minutos cada) com TBS-Cálcio (*trizma buffered saline*) foram realizadas.
6. Secagem e montagem das lâminas. Leitura com microscópio de epiluminescência Zeiss.

4.5 Introdução da Técnica de ELISA com Desmogleínas 1 e 3 Recombinantes.

ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) com desmogleínas 1 e 3 recombinantes. Fabricante do kit ELISA-DSG1/DSG3: Rhigene Inc., USA, meascup Dsg1-3 (product #M7593)

1. soros obtidos de pacientes portadores de pênfigo vulgar ou foliáceo são diluídos (1:1000) para um volume final de 300 microlitros (solução diluente: Tris-HCL, BSA, CaCl₂, *high five extract*)
2. Soros são homogenizados 3-4 vezes antes de serem incubados na placa de ELISA
3. incubação por 1 hora
4. Lavagem automatizada por 4 vezes, com o tampão de lavagem do kit ELISA
5. Incubação com o conjugado (anticorpo monoclonal murino anti-humano conjugado à *horseradishperoxidase*-HRP) por 1 hora
6. lavagem automatizada por 4 vezes, com o tampão de lavagem do kit ELISA
7. substrato (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio: TMB/H₂O₂)
8. Solução bloqueadora (0,1M ácido sulfúrico)
9. Leitura no espectrofotômetro (comprimento de onda: 450 nm)

Interpretação dos resultados:

Dsg-1 < 14 = resultado negativo; 14-20 = resultado duvidoso; >20 = resultado positivo

Dsg-3 < 9 = resultado negativo; 9-20 = resultado duvidoso; > 20 = resultado positivo

Cálculo dos resultados:

Unit Value (U/ml) = (A450 amostra - A450 calibrador negativo) (A450Dsg calibrador-A450 calibrador negativo)x100.

4.6 Imunofluorescência Direta (IFD)

A biópsia colhida do doente é armazenada com crioprotetor e colocada em freezer a -20° C. Em criostato a -20° C, o fragmento de pele ou mucosa é cortado a 4 micrômetros e colocado em lâmina salinizada (3 cortes por lâmina). Para a reação, os cortes recebem o conjugado (anti-imunoglobulina humana produzida em animal imunizado e associada a um fluorocromo = conjugado FITC) diluído em Azul de Evans (1:30).

Os conjugados utilizados são: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM e anti-C3 (todos adquiridos comercialmente, marca Sigma Aldrich, USA). Os cortes permanecem com o conjugado por 30 minutos, em câmara úmida sob temperatura ambiente, no escuro para ligação ao imunocomplexo. A seguir, as lâminas são lavadas em TBS (tampão trizma base com cloreto de cálcio)

pH 7.5 por dois períodos de 10 minutos cada ou um período de 20 minutos. Para a montagem das lâminas, utiliza-se glicerina tamponada (pH 8.5) e lamínula de vidro. A leitura é realizada em microscópio de fluorescência HBO 50w (filtro CB12) marca Carl Zeiss, com oculares de 10 vezes e objetiva de 16 vezes e 40 vezes. O resultado é dado em padrão e localização da fluorescência.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Foram avaliados 10 pacientes entre 1º de agosto de 2008 e 30 de janeiro de 2010, sendo sete do sexo feminino e três do masculino. Deste grupo, cinco pacientes caracterizavam-se como PV e cinco como PF. As idades dos pacientes variaram entre 24 e 70 anos com média de idade de 49 anos. O tempo de doença variou de 3 a 16 anos, com média de oito anos.

Os achados clínicos e laboratoriais estão representados na Tabela 1 e nas figuras 3A-E (pênfigo vulgar) e 4A-E (pênfigo foliáceo).

5.1 Pênfigo Vulgar com Envolvimento Umbilical

Foram avaliados cinco pacientes com pênfigo vulgar com idades entre 24 e 45 anos, sendo quatro do sexo feminino e um do sexo masculino. Os tempos de duração da doença variaram entre três e 16 anos. **Todos os pacientes apresentavam a forma mucocutânea da doença.** Todos os pacientes estavam em remissão parcial ou completa no momento da avaliação. A característica clínica predominante na região umbilical foi a presença de crostas, ou concomitância de lesões vegetantes (dois pacientes) ou eritema.

A histopatologia da região umbilical mostrou acantólise suprabasal e a imunofluorescência direta evidenciou depósito moderado de IgG e C3 em todas as cinco amostras colhidas da pele perilesional da região umbilical. Em um paciente (número 4), houve predominância de IgG com padrão intercelular suprabasal à IFD. Todos os pacientes com PV apresentavam autoanticorpos circulantes por IFI nos espaços intercelulares, com títulos de 1:320 a 1:5120.

Todos os pacientes de PV reconheceram Dsg1 e Dsg3 por ELISA, exceto o paciente número 4, que apresentou perfil positivo exclusivo para Dsg3. A variação do índice de anti-Dsg1 foi de 122 a 270. Os índices de anti-Dsg3 variaram entre 22 e 198.

<p>PV umbilical:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N=5 (PV mucocutâneo) • Clivagem suprabasal • IFD: IgG e C3 (80%); IgG (20%) • IFI: IgG (1:320 a 1:5120) • ELISA: anti-Dsg1=122-270 anti-Dsg3=22-198

Figura 3: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com pênfigo vulgar com comprometimento umbilical

5.2 Pênfigo Foliáceo com Envolvimento Umbilical

Foram avaliados cinco pacientes com pênfigo foliáceo, de 32 a 70 anos, sendo três do sexo feminino, e dois do sexo masculino. A duração do

PF variou entre 3 e 15 anos. Dos cinco pacientes, dois apresentavam a forma localizada (L) da doença e três a forma generalizada, invasivo-bolhosa (IB). Todos os pacientes encontravam-se em remissão parcial ou completa no momento da avaliação. A forma clínica predominante da lesão umbilical foi o eritema, seguido de eritema e crostas associados.

Os exames histopatológicos de todos os pacientes com PF mostraram clivagem subcórnea e acantólise. A imunofluorescência direta da pele perilesional evidenciou depósito intraepidérmico, moderado de IgG e C3 com padrão intercelular, exceto o paciente de número 7, no qual houve apenas depósito de IgG intercelular.

Todos os pacientes com PF apresentaram autoanticorpos nos espaços intercelulares com títulos variando de 1:160 a 1:2560 por IFI. Todos os pacientes apresentaram anti-Dsg1 (índices entre 24 e 220), e nenhum doente reconheceu anticorpos anti-Dsg3 por ELISA.

PF umbilical:
<ul style="list-style-type: none">• N=5 (2 localizados e 3 invasivo-bolhosos)• Clivagem subcórnea• IFD: IgG e C3 (80%); IgG (20%)• IFI: IgG (1:160 a 1:2560)• ELISA: anti-Dsg1=24-220 anti-Dsg3=0

Figura 4: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com pênfigo foliáceo e comprometimento umbilical

TABELA 1 - Dados Demográficos, Clínicos e Laboratoriais dos Pacientes com Pênfigo com Comprometimento Umbilical

Paciente N°/ Gênero/Idade	Duração da Doença (anos)	Clínica	Remissão Parcial ou Completa	Lesão Umbilical	HE	IFD	IFI	ELISA Dsg1 / Dsg3	
1/F/47	5	PV (MC)	Sim	Crostas e erosões	Clivagem suprabasal	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:320	122	167
2/F/59	16	PV (MC)	Sim	Crostas e vegetação	Clivagem suprabasal	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:640	128	22
3/F/69	6	PV (MC)	Sim	Eritema e vegetação	Clivagem suprabasal	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:2560	188	198
4/F/24	4	PV (MC)	Sim	Crostas	Clivagem suprabasal	IgG epidérmico intercelular	1:320	-	27
5/M/45	3	PV (MC)	Sim	Crostas e eritema	Clivagem suprabasal	IgG, C3 epidérmico	1:5120	270	198

						intercelular			
6/F/37	10	PF (L)	Sim	Eritema	Clivagem subcórnea	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:160	24	-
7/F/32	15	PF (G,IB)	Sim	Eritema	Clivagem subcórnea	IgG, epidérmico intercelular	1:160	218	-
8/M/46	15	PF (G,IB)	Sim	Eritema e crostas	Clivagem subcórnea	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:2560	218	-
9/F/65	5	PF (L)	Sim	Eritema	Clivagem subcórnea	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:320	220	-
10/M/70	3	PF (G,IB)	Sim	Eritema e crostas	Clivagem subcórnea	IgG, C3 epidérmico intercelular	1:640	209	-

Abreviações: F ,feminino; M, masculino; PV, pênfigo vulgar; MC , mucocutâneo; PF, pênfigo foliáceo; L, Localizado; G, Generalizado; IB, invasivo-bolhoso; HE, hematoxilina-eosina; IFD, imunofluorescência direta; IFI, imunofluorescência indireta; Dsg1, desmogleína 1; Dsg3, desmogleína 3; ELISA – cut off>20

Figura 5: 5A – 5F: Paciente #7 com eritema na região umbilical; 5B – Paciente #8 mostrando erosões e crostas na região umbilical; 5C – Paciente com pênfigo foliáceo exibindo erosões no tronco; 5D – Acanbólise subcórnea (HE, X400); 5E-ID: IgG com padrão interceular intraepidérmico (X200).; 5F- IFI: IgG anticorpos circulantes, 1:160 (X200)

Figura 6: 6A – Paciente exibindo erosões no lábio inferior; 6B – Bolhas, erosões e crostas na região anterior do tronco; 6C – Eritema e crostas na região umbilical; 6D – Pênfigo vulgar umbilical. Acantólise suprabasal e infiltrado inflamatório na derme. HE; OMx400; 6E-6F-IFD e IFI: Presença de IgG com padrão intercellular predominando nas camadas inferiores da epiderme (X200)

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Lesões umbilicais como manifestação clínica dos pênfigos vulgar e foliáceo têm sido raramente descritas na literatura. Em um artigo publicado em 1982 por Leroy, *et al* foi descrito um caso de uma paciente de 49 anos com um quadro de dermatose pustulose crônica lembrando acrodermatite de Hallopeau com numerosas lesões vegetantes localizadas na região genito crural, pubiana, submamária e umbilical. Havia intenso comprometimento ungueal, com onicólise e pústulas estéreis sem, todavia, notar-se a presença de bolhas ao longo da evolução da doença. A paciente também apresentava sinais clínicos de comprometimento mucoso. Em nenhum momento o autor do estudo descreve a presença de sinal de Nikolsky positivo. A biópsia de uma das lesões evidenciou a presença de acantólise suprabasal. A imunofluorescência direta evidenciava a presença de anticorpos IgG com padrão intercelular e a imunofluorescência indireta títulos que variaram de 1:10 a 1:160. Após a introdução de corticoterapia, a imunofluorescência se negativou dentro de 3 meses antes mesmo do desaparecimento das lesões vegetantes, inclusive a umbilical⁵¹.

Schmidt *et al.*, em 2009, publicou um relato de caso de uma paciente de 61 anos com quadro de penfigóide bolhoso envolvendo a região umbilical. A paciente relatava que há cerca de 3 anos iniciou quadro de eritema, prurido e erosões localizadas na região umbilical com sensação de queimação local. Não havia resposta clínica quando a paciente era tratada com antissépticos locais e, por vezes, a lesão umbilical desaparecia espontaneamente. Exames complementares tais como ultrassonografia local, culturas da região umbilical e mesmo exames micológicos a fim de descartar uma possível candidíase foram realizados todos resultando negativos. Por

suas comorbidades, a paciente encontrava-se em vigência de captopril, hidroclorotiazida, fenofibrato e citalopram. Todavia, não havia sincronicidade entre o início do uso destas medicações e o surgimento das lesões. A região umbilical apresentava eritema, erosões e vesículas tensas e não havia comprometimento das mucosas. O exame histopatológico revelou a presença de plano de clivagem suepidérmico com a presença de infiltrado linfocitário e eosinofílico na derme papilar. A imunofluorescência direta mostrou um denso depósito de IgG e C3, com padrão linear, ao longo da junção da derme com a epiderme. O *Salt Split Skin* mostrou fraca ligação de IgA no lado epidérmico e o *immunoblotting* foi positivo para o domínio da proteína BP 180 do penfigóide bolhoso. Esta lesão foi tratada com betametasona tópica com rápido desaparecimento e recrudescência quando a medicação era suspensa. Após 20 meses a lesão cicatrizou-se completamente⁵².

No caso acima, algumas particularidades chamavam a atenção, como a produção de anticorpos IgG e IgA associados na gênese da doença. Outra observação relevante foi o comprometimento umbilical. Sabe-se que a região umbilical frequentemente encontra-se afetada nos casos de penfigóide bolhoso⁵³. O penfigóide bolhoso restrito a esta região, entretanto, é incomum. Lesões umbilicais e periumbilicais também são comuns no penfigóide gestacional.

Outro dado interessante neste caso é que o perfil imunológico desta paciente não foi diferente do penfigóide bolhoso clássico. Isto foi observado também em outras formas de penfigóide bolhoso localizado tais como na região pré-tibial, face e couro cabeludo, onde há anticorpos reativos contra o domínio NC16A da proteína BP180. Isto sugere que estas formas localizadas da doença não são uma entidade à parte, e sim uma manifestação localizada da forma clássica da doença com pouca reatividade.

Depósitos de IgG e IgA concomitantes não são comuns. Todavia, um estudo realizado por Mulyowa *et al.*, mostrou que pacientes que desenvolvem penfigóide bolhoso com depósito de IgG ao longo da zona da membrana basal, quando comparados àqueles que apresentam depósitos por IgA, apresentam idade mais avançada⁵⁴.

O nosso estudo avaliou 10 indivíduos com envolvimento umbilical e pênfigo vulgar ou pênfigo foliáceo caracterizando-os do ponto de vista clínico e imunológico. As razões pelas quais o pênfigo se apresenta com envolvimento umbilical permanecem obscuras. Uma possível explicação estaria relacionada com a presença de anticorpos da família das caderinas ligando-se a resquícios embrionários do cordão umbilical, ou mesmo relativos à placenta nesta região, culminando no aparecimento de tais lesões.

Sabe-se que tais estruturas contêm receptores conhecidos como LILRB₁ e LILRB₂ (receptores leucocitários imunoglobulina-like)⁴⁴. Estes receptores leucocitários estão expressos no citotrofoblasto da decídua materna, sendo responsáveis, quando presentes, por imunossupressão e imunotolerância. Os macrófagos uterinos expressam estes receptores, tornando o útero um ambiente imunologicamente neutro para o feto. A modulação da expressão destes receptores é feita via HLA-G, que se encontra no cromossomo 17 do HLA-Ib. Pacientes com pênfigo vulgar expressam este antígeno na pele⁴⁰; o HLA-G atua como regulador de receptores LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor*) na placenta humana e cordão umbilical. Interagindo com as células dos tecidos extra-embrionários, o HLA-G atua na regulação da resposta leucocitária de tecidos como a placenta e cordão umbilical. Sua expressão na pele de pacientes com pênfigo vulgar são dados que poderiam se correlacionar, quando analisamos pacientes com pênfigo vulgar umbilical⁴¹.

O pênfigo é uma doença na qual anticorpos da classe IgG reconhecem proteínas específicas da pele no ectodomínio EC1-2 das desmogleínas. A semelhança

entre a sequência de aminoácidos que compõe este ectodomínio, e a sequência que compõe os receptores LILRB₁ poderia responder pela reação cruzada entre os anticorpos do pênfigo e seus receptores na região umbilical, justificando tal acometimento.

Particularidades relativas à expressão das desmogleínas nesta região do cordão umbilical poderiam ser responsáveis pelo aparecimento das lesões no cordão umbilical. A superfamília das caderinas (desmogleínas 1 a 4) e desmocollinas (1 a 3) são proteínas transmembranosas cálcio-dependentes⁵⁵. Os genes que codificam cerca de 30% a 50% da sequência dos aminoácidos que formam os desmossomos estão situados no cromossomo 18. Desmogleína 1 (165 kDa), desmogleína 2 (115 kDa), desmogleína 3 (130 kDa), e a desmogleína 4 (108 kDa) estão bem caracterizadas⁵⁶.

O comprometimento umbilical deve ser diferenciado de entidades outras tais como: granuloma piogênico, endometriose, fístulas intestinais, nódulos de *Sister Mary Joseph*. Nos pacientes por nós estudados, a biópsia local revelava critérios claros e suficientes para o diagnóstico de pênfigo. Todavia, não se sabe se há uma nova expressão de auto-antígenos locais na região umbilical, ou reação cruzada com as Dsg 1 e 3.

A região umbilical, por se tratar de um tecido cicatricial, poderia conter traços embrionários que expressariam novas proteínas de adesão, as quais poderiam agir como antígenos-alvo dos autoanticorpos do pênfigo. Estudos complementares para melhor analisar o perfil deste fenótipo singular de pênfigo devem ser realizados para maiores elucidações.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Este estudo descreveu uma manifestação clínica peculiar e rara dos pênfigos foliáceo e vulgar, caracterizada pelo comprometimento da região umbilical em 10 pacientes. Todos os pacientes apresentaram critérios clínicos, histopatológicos, e imunológicos compatíveis com pêfigo vulgar e foliáceo.
2. Correlações claras entre faixa etária, gravidade da doença, tendência à cronificação e recrudescência do quadro de pêfigo com o envolvimento umbilical não puderam ser estabelecidas. O comprometimento umbilical nos pênfigos não pôde ser interpretado como um marcador de evolução, tampouco de gravidade da doença.
3. A fisiopatogenia da agressão umbilical nos pênfigos permanece não esclarecida. Possíveis hipóteses incluem: (1) associação com a expressão de novos antígenos de adesão no local anatômico; (2) compartilhamento de características imunológicas entre o pêfigo e moduladores da resposta imunológica (antígeno HLA-G e os receptores LILRB) em tecidos cicatriciais embrionários nesta área.

8. ANEXOS

8.1 - ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA **FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
APTO:
BAIRRO: CIDADE
.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
.....

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA
Perfil Clínico e Imunológico dos Pênfigos Vulgar e Foliáceo com Envolvimento
Umbilical

PESQUISADOR: JOSÉ VITOR DE OLIVEIRA JÚNIOR

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO DERMATOLOGISTA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 115046.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa; **2.** procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; **3.** desconfortos e riscos esperados; **4.** benefícios que poderão ser obtidos; **5.** procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Convidamos o(a) senhor(a) a participar de uma pesquisa que vai investigar, na pele do umbigo e no seu sangue, a presença de anticorpos (moléculas de defesa do corpo) que podem surgir nos pênfigos. Para participar da pesquisa, o(a) senhor(a) deverá responder algumas perguntas de um questionário, fazer uma consulta médica e doar 5 ml de seu sangue.

Este estudo consiste em avaliar os pacientes com a doença pênfigo vulgar e pênfigo foliáceo, que apresentaram comprometimento da região umbilical durante o intercurso da mesma uma vez que esta forma de apresentação é incomum no nosso meio. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária no estudo, que visa avaliar o perfil clínico e imunológico dos pacientes com doença nesta localização.

Todos os pacientes que participarem do estudo, realizaram ou realizarão biópsia ,imunofluorescência da pele da região umbilical afetada pelo pênfigo e coleta de 10 ml de sangue para realização de imunofluorescência indireta e ELISA. A biópsia é feita através da utilização de um punch (material que retira uma porção de pele) após anestesia local prévia apropriadamente realizada. Após este fragmento de pele será encaminhado para estudo e avaliação. A realização desta biópsia não implicará em riscos, exceto no fato de o paciente permanecer com pontos de sutura local os quais o paciente deve se comprometer a se dirigir ao departamento de dermatologia para a

retirada dos mesmos. Será coletado 10 ml de sangue do paciente sendo que a mesma não implicará em riscos para o paciente. No final do estudo, o benefício do paciente será, além de contribuir para o progresso da ciência, ter uma definição mais exata dos motivos pelos quais ele veio apresentar lesão nesta região, o que não comumente ocorre.

Em qualquer momento do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Valéria Aoki, que pode ser encontrada no endereço: Rua Dr. Enéas de Carvalho, Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no departamento de Dermatologia. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição assim como é garantido o direito à atualização do paciente. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. 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.

Todo material coletado será destinado somente à realização da pesquisa, sem nenhum outro fim, assim como de todos os dados complementares que forem coletados.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DOS PÊNFIGOS VULGAR E FOLIÁCEO COM MANIFESTAÇÃO NA REGIÃO UMBILICAL” . Eu discuti com a Dra. Valéria Aoki sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha

participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

8.2 - ANEXO II: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA MÉDICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPESQ

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPesq**

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)

Nº do Protocolo:

Tipo: Humanos

Instituto: ICHC

Registro on-line nº: **3414**

Data de Entrada:

1. Título do Protocolo de Pesquisa

PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DO PÊNFIGO VULGAR E FOLIÁCEO COM
MANIFESTAÇÃO NA REGIÃO UMBILICAL.

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

PÊNFIGO VULGAR, REGIÃO UMBILICAL, AUTOIMUNIDADE

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

RESUMO

INTRODUÇÃO : O pênfigo vulgar é uma doença autoimune adquirida na qual anticorpos da classe IgG atuam contra proteínas desmossômicas alvo produzindo bolhas mucocutâneas. A desmogleína 3 é o maior antígeno alvo do pênfigo vulgar, uma glicoproteína de 130-kDa que se liga à placoglobina, proteínas da família das caderinas, sendo que, em 50% a 60% dos casos, há anticorpos adicionais contra a desmogleína 1, o antígeno alvo do pênfigo foliáceo. O anticorpo envolvido é o maior determinante do fenótipo no pênfigo vulgar. O diagnóstico desta entidade deve ser suspeitado em qualquer situação que implique no aparecimento de bolhas na pele e erosões mucocutâneas, sendo a cavidade oral o primeiro sítio topográfico a ser comprometido. Anticorpos da classe IgG contra a superfície dos queratinócitos são os responsáveis pela formação das bolhas tanto no pênfigo foliáceo quanto no vulgar,

determinando a formação de bolhas supra-basais neste último caso. A imunofluorescência direta e, em 75% dos casos, a indireta, são positivas para anticorpos da classe IgG nesta forma da doença.

O surgimento de lesões na região umbilical em pacientes que estão sendo acompanhados no ambulatório de dermatoses bolhosas auto-imunes do Hospital das Clínicas no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo tem sido observado o que se constitui em uma manifestação atípica da doença, até então não descrita na literatura após ampla revisão bibliográfica. Assim sendo, a relação entre pênfigo vulgar e comprometimento da região umbilical permanece não elucidada. Isto poderia resultar da expressão de desmogleína nesta região, antígenos de superfície relacionados particularmente ao sistema HLA-G segundo Yari F *et al*, uma vez que pacientes com pênfigo vulgar expressam na pele antígenos HLA-G do sistema HLA classe I, assim como a possíveis resquícios embriológicos que compõem esta região, tais como estruturas do próprio cordão umbilical ou mesmo da placenta humana.

OBJETIVO: Avaliar o perfil clínico e imunológico do pênfigo vulgar com surgimento de lesões na região umbilical em pacientes que estão sendo acompanhados no ambulatório de dermatoses bolhosas auto-imunes do Hospital das Clínicas no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: Os pacientes que serão estudados estão em acompanhamento no ambulatório de Doenças Vésico-Bolhosas Auto-Imunes do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, com idade superior a 18 anos. Serão incluídos os indivíduos do sexo masculino e feminino que apresentaram exame histopatológico compatível com pênfigo vulgar ou pênfigo foliáceo e comprometimento da região umbilical. Serão estudados 10 pacientes, desde que de acordo com a inclusão no estudo. A metodologia utilizada será a análise do diagnóstico, evolução clínica e sorologia dos doentes com pênfigo vulgar e foliáceo através do quadro clínico, biópsia local, imunofluorescência indireta e ELISA dos pacientes envolvidos neste grupo. A captação de dados será realizada através de uma ficha com informações técnicas acerca de dados epidemiológicos e clínicos. Destes, será feita revisão de prontuário e seleção nos arquivos do bloco de parafina de biópsia previamente realizada, para realização de estudo imunoistoquímico. Os pacientes serão incluídos no estudo após assinarem termo de consentimento informado.

4. Pesquisador Responsável:

Dra. Valéria Aoki

CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/2524292424709945>

5. Pesquisador Executante:

José Vitor de Oliveira Júnior

6. Possui co-autores?

Sim

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Dermatologia

Disciplina: Dermatologia

LIM: LIM/53 - Lab Imunologia

8. Existe entidade externa envolvida?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Mestrado

13. Investigação

Retrospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Prontuários de pacientes

Tecidos, órgãos, fluídos orgânicos

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Clínica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Nenhuma das alternativas

17. Patrocínio

Não

18. Valor do financiamento**19. Cronograma de execução da pesquisa**

Início: 01/04/2009

término: 01/04/2011

Prazo: 24 meses

20. Assinaturas

Assinatura e carimbo do Investigador

Aprovado em ____/____/____.

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento

Aprovado em ____/____/____.

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPEU, do Departamento de Clínica das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/07/2009, APROVOU o Projeto de Pesquisa nº 0462/09, intitulado: **PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DO PÊNFIGO VULGAR COM MANIFESTAÇÃO NA REGIÃO UMBILICAL** apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, a quem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,

Começa a vigorar, após a leitura e aprovação da CAPPEU, as alterações acordadas e finalizadas, sob a Resolução da Comissão de Ética em 10/10/1998 (Resolução nº 10/98).

Participante responsável: Dr. Valério Aoki

Felicitador(es) Executor(es): José Vilas Boas, Oliveira Junior

CAPPEU nº 0462/09 de 2009

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

Documento de Pesquisa Análise de Ética nº 0462/09 da FmC/USP, sob a supervisão da
Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Rua Dr. Arnaldo, 455, São Paulo, SP, 05508-900, Brasil. Telefone: (11) 2662-0442. E-mail: cappeu@fmc.usp.br e
cappeu@fmc.usp.br

8.3 - ANEXO III: PUBLICAÇÃO DO PAPER

C E D	4 4 6 8	B	Dispatch: 2.8.12	Journal: CED	CE: Gayathri J.
Journal Name		Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 5	PE: Radhika
Clinical dermatology • Original article				CED Clinical and Experimental Dermatology		

Clinical and immunological profile of umbilical involvement in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus

J. V. Oliveira Júnior, C. W. Maruta,* J. X Sousa Jr,* C. G. Santi,* N. Y. S. Valente,* L. M. F. Ichimura,† A. M. Périgo† and V. Aoki*

Department of Dermatology, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, São Paulo, Brazil; *Department of Dermatology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil; and †Immunopathology Laboratory, Hospital das Clínicas FMUSP, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

doi:10.1111/j.1365-2230.2012.04468.x

Summary

Background. Pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF) are autoimmune vesicobullous disorders with IgG autoantibodies directed against desmoglein (Dsg)1 and 3, which lead to intraepidermal acantholysis.

Aim. To characterize the clinical and immunological profile of patients with PF or PV with umbilical involvement.

Methods. In total, 10 patients (seven women, three men; age range 24–70 years, disease duration 3–16 years) diagnosed with either PV ($n = 5$) or mucocutaneous PF ($n = 5$) were assessed according to their clinical features, histopathology and immunological findings [direct and indirect immunofluorescence (DIF and IIF) and ELISA with recombinant Dsg1 and Dsg3].

Results. Erythema, erosions, crusts and vegetating skin lesions were the main clinical features of the umbilical region. DIF of the umbilical region gave positive results for intercellular epidermal IgG and C3 deposits in eight patients and for IgG alone in the other two. Indirect immunofluorescence with IgG conjugate showing the typical pemphigus pattern was positive in all 10 patients, with titres varying from 1 : 160 to 1 : 2560. ELISA with recombinant Dsg1 gave scores of 24–266 in PF and 0–270 in PV. Reactivity to recombinant Dsg3 was positive in all five patients with PV (ELISA 22–98) and was negative in all PF sera.

Conclusions. All 10 patients with pemphigus with umbilical presentation had the clinical and immunopathological features of either PF or PV. This peculiar presentation, not yet completely elucidated, has rarely been reported in the literature. A possible explanation for this unique presentation may be the presence of either novel epitopes or an association with embryonic or scar tissue located in the umbilical-cord region.

Introduction

Pemphigus is a rare autoimmune blistering disease, characterized by a chronic course, and it may evolve to a severe or even lethal disease. Based on the clinical picture and profile of circulating pemphigus antibodies,

two main forms of the disease have been described: pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF).¹ In PV, three subtypes have been described, according to the site of involvement: mucous, cutaneous or mucocutaneous PV. In PF, the absence of mucous features is a helpful sign to differentiate these two forms of epidermal detachment.²

Desmoglein (Dsg)1 and Dsg3 are the main pemphigus target antigens. Dsg3 auto-antibodies are usually detected in PV, and in approximately 50% of the cases, Dsg1 auto-antibodies may also be found, especially in mucocutaneous forms.² Binding of IgG and C3 to the

Correspondence: Dr Valeria Aoki, Avenida Dr Enéas de Carvalho Aguiar, Cerqueira César, São Paulo, Brazil
E-mail: valeria.aoki@gmail.com

Conflict of interest: none declared.

Accepted for publication 15 May 2012

target antigens leads to failure of the adhesive function of Dsg, and culminates in acantholysis.³

Methods

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Brazil and an informed consent was obtained from all participants.

Patients

Patients who attended the attending the Autoimmune Blistering Diseases Clinic in the Department of Dermatology between 1 August 2008 and 30 January 2010. Data concerning age, gender, race and duration of disease were collected.

The diagnosis of PV was based on (i) mucosal or mucocutaneous superficial blisters with a positive Nikolsky sign, with umbilical involvement; (ii) the histological features of suprabasilar cleavage and acantholysis; (iii) direct immunofluorescence (DIF) findings of intraepithelial tissue-bound IgG and/or C3 auto-antibodies in an intercellular pattern; (iv) circulating IgG antibodies bound to the intercellular spaces of human foreskin; (v) and IgG autoantibodies that recognize recombinant Dsg1 and Dsg3, identified by ELISA (cut-off index value 20).^{3,4}

In total, 10 patients (7 women, 3 men; mean age 49 years, range 24–70) diagnosed with either PV ($n = 5$) or mucocutaneous PF ($n = 5$), were enrolled. Disease duration was 3–16 years. There were nine patients of white ethnicity and one of African ethnicity. Three patients with PF came from areas in which PF was endemic.

The clinical and laboratory findings of all pemphigus patients are listed on Table 1. Biopsies were taken from the umbilical area for histological examination.

Results

The umbilical lesions presented either as discoloured papules or erythematous crusted lesions in or around the umbilicus.

All patients with PV had the mucocutaneous presentation (Fig. 1). The histological findings were of suprabasilar (PV) acantholysis. DIF showed moderate, intercellular deposits of IgG and C3 staining in all five biopsies. In one case, intercellular IgG staining was predominant in the suprabasilar layers. Serum samples of all five patients with PV tested with human foreskin substrate produced auto-antibodies within the epidermal intercellular spaces, with titres ranging from 1 : 320 to 1 : 2560. ELISA showed antibodies to both Dsg1 and Dsg3 profile in all but one patient, who had

Table 1 Pemphigus with umbilical involvement: Clinical and laboratory profile.

Patient	Gender/ age, years	Disease duration, years	Clinical presentation	Umbilical lesions	Haematoxylin and eosin	DIF pattern	IIF titre	ELISA	
								Dsg1	Dsg 3
1	F/47	5	PV (MC)	Crusts and erosions	Suprabasilar cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 320	122	167
2	F/59	16	PV (MC)	Crusts and vegetation	Suprabasilar cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 640	128	22
3	F/69	6	PV (MC)	Erythema and vegetation	Suprabasilar cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 2560	188	198
4	F/24	4	PV (MC)	Crusts	Suprabasilar cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG)	1 : 320	–	27
5	M/45	3	PV MC	Crusts and erythema	Suprabasilar cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 5120	270	198
6	F/37	10	PF L	Erythema	Subcorneal bulla acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 160	24	–
7	F/32	15	PF G, BI	Erythema	Subcorneal cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG)	1 : 160	266	–
8	M/46	15	PF G, BI	Erythema and crusts	Subcorneal cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 2560	218	–
9	F/65	5	PF L	Erythema	Subcorneal cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 320	220	–
10	M/70	3	PF G, BI	Erythema and crusts	Subcorneal cleavage acantholysis	Intraepidermal intercellular (IgG and C3)	1 : 640	209	–

–, Negative; BI, bullous, invasive (erosions); DIF, direct immunofluorescence; Dsg, desmoglein; G, generalized; IIF, indirect immunofluorescence; L, localized; MC, mucocutaneous; PF, pemphigus foliaceus; PV, pemphigus vulgaris.

Figure 1 Feature of pemphigus vulgaris (patient 1). (a) Erosions on the lower lip; (b) blisters, erosion and crusts on the anterior trunk; (c) erythema and crusting in the umbilical region. (d) Suprabasal acantholysis and scanty inflammatory infiltrate in the dermis (haematoxylin and eosin, original magnification $\times 400$). (e) Direct immunofluorescence, showing intercellular staining for IgG, predominantly in the lower layers of the epidermis (original magnification $\times 200$). (f) Indirect immunofluorescence with IgG circulating antibodies, at a titre of 1 : 320 (original magnification $\times 200$).

anti-Dsg3 antibodies exclusively. The ELISA index was 122–270 for Dsg1, and 22–198 for Dsg3.

Patients with PF had either the localized or the generalized blistering forms (Fig. 2). The histological findings on biopsy were of subcorneal acantholysis. DIF identified a moderate intercellular IgG and C3 staining in all five biopsies. Serum samples of all five patients with PF produced auto-antibodies against Dsg1 within the epidermal intercellular spaces of human foreskin, with titres ranging from 1 : 160 to 1 : 2560. ELISA detected anti-Dsg1 antibody in all patients, with an index of 24–266. No anti-Dsg3 antibody was seen in any patient.

Discussion

Pemphigus is a blistering disease that causes lesions on various parts of the body. Umbilical lesions as a clinical

feature of PF or PV have rarely been reported, and are usually associated with pemphigus vegetans.^{4,5} In this study, we evaluated 10 patients with either PF or PV with umbilical involvement, and assessed their clinical and immunological profile.

The reasons why an umbilical lesion may be a presenting feature of pemphigus remain unclear. A possible explanation may be related to antibodies binding to the cadherin superfamily in embryonic remains on the umbilical cord or placenta. These structures contain leucocyte immunoglobulin-like receptor (LILR)B1 and LILRB2,⁶ which modulated by human leucocyte antigen (HLA)-G. HLA-G is a major histocompatibility class antigen IB, and is strongly expressed in cells of cytotrophoblast.^{7–9} The gene encoding for HLA-G is located on chromosome 17 of HLA-IB, and studies provide substantial evidence for its

Figure 2 Features of pemphigus foliaceus. (a) Erythema on the umbilicus (patient 6); (b) erosions and crusts on the umbilical area (patient 10); (c) erosions on the trunk (patient 8). d) Subcorneal acantholysis (haematoxylin and eosin, original magnification $\times 400$). (e.) Direct immunofluorescence, showing intercellular staining for IgG within the epidermis (original magnification $\times 200$). (f) Indirect immunofluorescence, showing circulating antibodies, at a titre of 1 : 160 (original magnification $\times 200$).

ability to direct immunosuppressive cells in this region LILRB1 and LILRB2.^{10–12}

Pemphigus is a disease in which antibodies of the IgG class attack specific proteins in the skin via their connection to the ectodomain EC1 of desmogleins, therefore, a structural similarity in amino acid sequence between the Dsg ectodomain and LILRB1 might result

in crossreaction between the pemphigus antibodies and receptors in the umbilical structures, producing injury.

Peculiarities in the expression of Dsg in the umbilical cord might also be responsible for the appearance of lesions in this region. The cadherin superfamily (Dsg1–4 and desmocollin 1–3) are calcium-dependent transmembrane glycoproteins.¹³ The genes encoding

desmosomes, which share about 30–50% amino acid homology, are located on chromosome 18.¹⁴ Dsg1 (165 kDa), Dsg2 (115 kDa), Dsg3 (130 kDa)^{15–17} and Dsg4 (108 kDa, found in hair follicle) have been well characterized.¹⁸

Our patients presented the typical features of mucocutaneous PV (two of the five had vegetating lesions) or PF (localized or bullous invasive forms). The umbilical presentation needs to be correctly diagnosed, as it may resemble other skin conditions, such as pyogenic granuloma or even an intestinal fistula. All 10 patients fulfilled the criteria for either PV or PF.

Conclusion

We report 10 patients with lesions of PV or PF in the umbilical region. The umbilicus is a scar tissue and may contain traces of embryonic cells, which might express a hidden or novel adhesion protein connected with cell-cell adhesion, which could act as an antigenic target for pemphigus antibodies. Further studies to better analyse the autoimmune profile of this unique pemphigus phenotype should be conducted.

What's already known about this topic?

- Xxxxxx
- 2 • Xxxxxx

What does this study add?

- Xxxxxx
- Xxxxxx

Acknowledgement

This work was supported by CNPq (grant #476954/2010–0).

References

- 1 Uclely MC, Stanley JR. Pemphigus – diseases of antidesmosomal autoimmunity. *JAMA* 1999; **282**: 572–6.
- 2 Ding X, Aoki V, Mascaro JM Jr et al. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 1997; **109**: 592–6.
- 3 Culton DA, Qian Y, Li N et al. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (FogoSelvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *J Autoimmun* 2008; **31**: 311–24.
- 4 Winkelmann RK, Su WP. Pemphigoid vegetans. *Arch Dermatol* 1979; **115**: 446–8.
- 5 Leroy D, Lebrun J, Maillard V et al. Pemphigus vegetans, a clinical type of chronic pustular dermatitis of Hallopeau. *Ann Dermatol Venereol* 1982; **109**: 549–55.
- 6 Petroff MG, Sedlmayr P, Azzola D, Hunt JS. Decidual macrophages are potentially susceptible to inhibition by class Ia and class Ib HLA molecules. *J Reprod Immunol* 2001; **56**: 3–17.
- 7 Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 1986; **59**: 595–601.
- 8 Kovats S, Main EK, Librach C et al. A class I antigen, HLA-G, is expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; **248**: 220–3.
- 9 Morales PJ, Pace JL, Platt JS et al. Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* 2003; **171**: 6215–24.
- 10 Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005; **19**: 681–93.
- 11 Hunt JS. Stranger in a strange land. *Immunol Rev* 2006; **213**: 36–47.
- 12 Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 2007; **17**: 469–79.
- 13 Buxton RS, Cowin P, Franke WW et al. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993; **121**: 481–3.
- 14 Cowley CM, Simrak D, Marsden MD et al. A YAC contig joining the desmocollin and desmoglein loci on human chromosome 18 and ordering of the desmocollin genes. *Genomics* 1997; **42**: 208–16.
- 15 Amagai M, Klaus-kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; **67**: 869–77.
- 16 Arnemann J, Spurr NK, Wheeler GN et al. Chromosomal assignment of the human genes coding for the major proteins of the desmosome junction, desmoglein DGI (DSG), desmocollins DGII/III (DSC), desmoplakins DPI/II (DSP), and plakoglobin DPIII (JUP). *Genomics* 1991; **10**: 640–5.
- 17 Jones JC, Yokoo KM, Goldman RD. A cell surface desmosome-associated component: identification of tissue-specific cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7282–6.
- 18 Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 2003; **113**: 249–60.
- 19 Whittcock NV, Bower C. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *J Invest Dermatol* 2003; **120**: 523–30.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. Lever WF. Pemphigus. Emedicine 32: 2-132
2. Bystryn JC, Rudolph JL. Pemphigus. Lancet, 2005; 366: 61-73
3. Schmidt E, Brocker EB, Zillikens D. Pemphigus. Loss of Desmosomal Cell-Cell Contact. Der Hautarzt; Zeitschrift Dermatol Venerologie Verwandte Gebiete, 2005; 51: 309-318.
4. Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, Bullous Impetigo and the Staphylococcal Scalded-skin Syndrome. New England J Med, 2006; 355: 1800-1810.
5. Yeh SW, Ahmed B, Samin, Razzaque Ahmed A . Blistering Disorders: Diagnosis and Treatment. Dermatol Therapy, 2003; 16:214-223
6. Aoki V, Millikan RC, Rivitti EA, Hans-Filho G, Eaton DP, Warren SJ, Li N, Hilario-Vargas J, Hoffmann RG, Diaz LA. Enviromental Risk Factors in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). J Invest Dermatol Symp Proc/Soc Invest Dermatol, 2004; Inc 9:34-40
7. Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, Almeida FA, Castro RM, Macca ML, Lavrado C et al. Endemic

- Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): Current and Historic Epidemiologic Studies. *J Invest Dermatol*, 1989; 92: 4-12.
8. Anhalt GJ. Pemphigus Vulgaris, Foliaceus, and Paraneoplastic. In: Fine JD, editor. *Bullous Diseases*. New York: Igaku-Shoin, 1993; p.52-74.
 9. Anhalt GJ, Labib RS, Vourhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of Pemphigus in Neonatal Mice by Passive Transfer of IgG from Patient with the Disease. *New Engl J Med*, 1982; 306: 1189-1196.
 10. Sitaru C, Zillikens D. Mechanisms of Blister Induction by Autoantibodies. *Exp Dermatol*, 2005; 14 : 861-875.
 11. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The Clinical Phenotype of Pemphigus is Defined by the Anti-Desmoglein Autoantibody Profile. *J Am Acad Dermatol*, 1999 ; 40: 167-170.
 12. Anhalt GJ. Bullous Skin Diseases. In: Frank MM, Austen KF, Claman HN, Unanue ER, editors. *Santer's Immunologic Diseases*. 5 th edition .USA. Little, Brown and Company ,1995; .p.1179-1182.
 13. Aoki V, Sousa JX Jr, Diaz LA; Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin*. 2011; Jul; 29(3):413-8, viii. Review.

14. Hashimoto K, Lever WF. An electron microscopic study of pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement. *J Invest Dermatol.* 1967; 48: 540-552.
15. Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, et al. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: A time course study of clinical, immunologic, ultrastructural and cytochemical changes. *J Invest Dermatol.* 1985; 84:41-46.
16. Lever WF. Pemphigus and Pemphigoid. Springfield, IL:Charles C Thomas Publishers; 1965.
17. Sami N, Bhol KC, Ahmed AR. Diagnostic features of pemphigus vulgaris in patients with pemphigus foliaceus : detection of both antibodies, long term follow-up and treatment responses. *Clin Exp Immunol.* 2001;125:492-498.
18. Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, Nishikawa T. Absorption of Pathogenic Autoantibodies by the Extracellular Domain of Pemphigus Vulgaris Antigen Produced by Baculovirus. *J Clin Invest.* 1994; 94: 59 – 67.
19. Harman KE, Gratian MJ, Bogal BS et al. A Study of Desmoglein 1 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Racial Differences in Frequency and the Association with a More Severe Phenotype. *Br J Dermatol.*

2000; 143:343-8.

20. Ding X; Aoki V, Mascaro JM et al. Mucosal and Mucocutaneous (Generalized) Pemphigus Vulgaris Show Distinct Autoantibodies Profiles. *J Invest Dermatol.* 1997;109: 592-596.
21. Wolf R, Landau M, Tur E, Brenner S. Early Treatment of Pemphigus does not Improve the Prognosis. A Review of 53 Patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1995;4: 131-6.
22. Chrysomallis F, Ioannides D, Teknetzis A et al. Treatment for oral Pemphigus. *Int J Dermatol.* 1994; 33: 803-7.
23. Swlly C, Paes de Almeida O, Porter SR, Gilkes JJH. Pemphigus Vulgaris: The Manifestations and Long-Term. Management of 55 Patients with oral Lesions. *Br J Dermatol.* 1999; 140: 84-9.
24. Bhol K, Natarajan K, Nagarwaha N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed RA. Correlation of Peptide and IgG Subclass With Pathogenic and Nonpathogenic Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. A Model for Immunity. *Proc Nati Acad SCI USA .* 1995; 92: 5239-43.
25. Schmidt E, Brocker EB, Zillikens D. Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact. *Der Hautarzt; Zeitschrift Dermatol Venerologie verwandte Gebiete.* 2000; 51:309-318.

26. Buxton RS, Cowin P, Francke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, Koch PJ, Magee AI, Rees DA, Stanley JR et al. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol.* 1993; 121:481-483.

27. Den Z, Cheg X, Merched-Sauvage M, Koch PJ. Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. *J Cell Sci.* 2006; 119: 482-489.

28. Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci.* 2006; 119:797-806.

29. Elias PM, Matsuyoshi N, Wu H, Lin C, Wang ZH, Brown BE, Stanley JR. Desmoglein Isoform Distribution Affects Stratum Corneum Structure and Function. *J Cell Biol.* 2001; 153(2): 243-250.

30. Brennan D, Hu Y, Joubert S, Choi YW, Whitaker-Menezes D, O'Brien T, Uitto J, Rodeck U, Mahoney MG. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci.* 2007; 120:758-771.

31. Muller EJ, Williamson L, Kollu C, Suter MM. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol.* 2008a; 128:501-516.

32. Williamson L, Hunziker T, Suter MM, Muller EJ. Nuclear c-Myc: a molecular marker for early stage pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2007; 127:1549-1555.
33. Williamson L, Raess NA, Caldelari R, Zakher A, de Bruin A, Posthaus H, Bolli R, Hunziker T, Suter MM, Muller EJ. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J.* 2006; 25:3298-3309.
34. Farb RM, Dykes R, Lazarus GS. Anti-epidermal-cell surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Medical Sciences.* 1978; 75: 459-463.
35. Feliciani C, Toto P, Wang B, Sauder DN, Amerio P, Tulli A. Urokinase plasminogen activator mRNA is induced by IL-1 alpha and TNF-alpha in in vitro acantholysis. *Exp Dermatol.* 2003; 12(4): 466-71.
36. Cirillo N, Lanza M, Femiano F, Gaeta GM, De Rosa A, Gombos F, Lanza A. If pemphigus vulgaris IgG are the cause of acantholysis, new IgG-independent mechanisms are the concause. *J Cell Physiol.* 2007c; 212:563-567.
37. Moore KL, TVN Persaud . *Embriologia Clínica*, 7a edição. São Paulo. Elsevier Brazil: 2008; p 149.

38. Sadler TW, Langman S. Langman's Medical Embryology, 7^a edition. Lippincott Williams & Wilkins: 2009; p 111.
39. F Gary Cunningham; Ganti NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Williams Obstetrics, 21^a edition. McGraw-Hill: 2009; p 110.
40. Expression of HLA-G in the Skin of Patients with Pemphigus Vulgaris. Yari F, Zavarani Hosseini A, Nemat Gorgani M, Khorramizadeh MR, Mansouri P, Kazemnejad A. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2008; vol (march) 7: 7-12.
41. McIntire RH, Sifers T, Platt JS, Ganacias KG, Langat DK, Hunt JJ. Novel HLA-G Binding Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LILR) Expression Patterns in Human Placenta and Umbilical Cords. Placenta. 2008; 29 : 631-638.
42. Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. Immunology. 1986; 59: 595-601
43. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen HLA-G expressed in human trophoblasts. Science. 1990; 248:220-3.

44. Petroff MG, Sedlmayr P, Azzola D, Hunt JS. Decidual macrophages are potentially susceptible to inhibition by class Ia and class Ib HLA molecules. *J Reprod Immunol*. 2002; 56:3-17.

45. Allan DS, McMichael AJ, Braud VM. The ILT family of leukocyte receptors. *Immunobiology*. 2000; 202:34-41.

46. Shirolshi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:8856-61.

47. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC et al. Alloantigen specific CD8 – CD28 – FOXP3 – T suppressor cells induce ILT3+ ILT4- tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*. 2004; 16:1055-68.

48. Fors P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustimani J, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*. 2006; 108: 2608-15.

49. Culton DA, Qian Y, Li N, Rubenstein D, Aoki V, Hans Filho G, et al. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo

- Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *J Autoimmun.* Dec 2008; 31(4): 311-324.
50. Winkelmann RK, Su WP. Pemphigoid Vegetans. *Arch Dermatol.* 1979 Apr; 115(4): 446-8.
51. Leroy D, Hebrum J, Maillard V, Mandard JC, Deschamps P. Pemphigus Végétant a Type Clinique de Dermatite Pustuleuse Chronique de Hallopeau. *Ann Dermatol. Venereol. (Paris).* 1982; 109:549-555.
52. Schmidt E, Benoit S, Brücker EB. Bullous Pemphigoid with Localized Umbilical Involvement. *Acta Derm Venereol.* 2009; 89(4):419-20.
53. Di Zenzo G, Marazza G, Borradori L, Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol.* 2007; 23:257-288.
54. Mulyowa GK, Jaeger G, Kabakyenga J, Brocker EB, Zillikens D, Schmidt E. Autoimmune subepidermal blistering diseases in Uganda: correlation of autoantibody class with age of patients. *Int J Dermatol.* 2006; 45:1047-1052.
55. Arnemann J, Spurr NK, Wheeler GN, Parker AE, Buxton RS. Chromosomal assignment of the human genes coding for the major

proteins of the desmosome junction, desmoglein DGI (DSG), desmocollins DGII/III (DSC), desmoplakins DPI/II (DSP), and plakoglobin DPIII (JUP). *Genomics*. 1991; 10:640-645.

56. Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez MirA, O'Shaughnessy R, Mahoney *et al.* Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*. 2003; 113:249-260.

57. Waschke J. The Desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130:21-54.