Denise Miyamoto

**Avaliação da expressão do fator de crescimento
endotelial vascular e da endoglina nos pacientes
eritrodérmicos com pênfigo foliáceo**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Aoki

Coorientador: Prof. Dr. Miguel N. Burnier Jr.

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Miyamoto, Denise

Avaliação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular e da endoglinina nos pacientes eritrodérmicos com pênfigo foliáceo / Denise Miyamoto. -- São Paulo, 2017.

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

Orientadora: Valéria Aoki.

Coorientador: Miguel Noel Burnier Júnior

Descritores: 1.Pênfigo 2.Dermatite esfoliativa 3.Fator A de crescimento do endotélio vascular 4.Moduladores da angiogênese 5. Imuno-histoquímica 6. Técnica direta de fluorescência para anticorpo

USP/FM/DBD-143/17

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MIYAMOTO, Denise

Título: Avaliação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular e da endogлина nos pacientes eritrodérmicos com pênfigo foliáceo

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ney e Helena, pessoas incríveis e meus maiores exemplos de caráter e integridade. Por seu amor e apoio incondicionais, por sua generosidade e carinho constantes, e por tornarem possíveis os melhores momentos da minha vida.

À minha irmã maravilhosa, Cristina, minha grande amiga e companheira, protetora em todos os momentos. Por ser meu modelo de perseverança e de coragem, por estar sempre presente e disposta a me ajudar a alcançar meus sonhos.

Às minhas tias Helia (*in memoriam*), Rosa e Margarida, verdadeiros anjos que abençoam e enchem minha vida de alegria. Por sua generosidade, por acreditarem em mim e por tornarem tudo tão especial.

Ao meu querido Carlos, por seu amor e amizade, por sua paciência e compreensão, por me apoiar e me incentivar a alcançar meus objetivos e por tornar meus dias ainda mais felizes.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Valeria Aoki, minha orientadora e meu exemplo desde os primeiros anos da faculdade de medicina, por sua sabedoria e competência, por sua amizade e motivação.

Ao Prof. Dr. Miguel N. Burnier Jr, meu orientador e grande mestre, por sua generosidade e atenção, por nos incentivar a crescer e a fazer o melhor pelos pacientes. À Sra. Nora Burnier, por sempre cuidar de todos com muita ternura e fazer com que se sintam especiais.

Às Profas. Dras. Celina Wakisaka Maruta e Claudia Giuli Santi, pelos ensinamentos e apoio, e pela busca constante do melhor para os pacientes, os alunos e o Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Aos queridos amigos Ligia Maria Ichimura Fukumori, Alexandre Marques Perigo, Eliete Celestina da Silva e Drs. Luciana de Paula Samorano Lima, Raquel Leão Orfali, Livia Delgado, Mariana Zaniboni, Roberto Takaoka e Camila Sayuri Vicentini Otani – pelo carinho e amizade, e pelo delicioso convívio.

Aos Profs. Drs. José Antônio Sanches Junior e Cyro Festa Neto, aos médicos assistentes, preceptores, residentes, à equipe de enfermagem e aos funcionários do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, pelo apoio e incentivo.

À FMUSP, e aos amigos incríveis e professores com quem tive o privilégio de conviver, e que me ensinaram o que é ser médica.

À querida Dra. Clarice Plopper e à equipe da Clínica Plopper, por acreditarem em mim desde o início, por me encorajarem e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos grandes amigos do MUHC-McGill Ocular Pathology Laboratory, por toda ajuda e companheirismo, e pelo entusiasmo pela pesquisa científica. Em especial à Tiffany Porraccio e ao José João Mansure, por sua paciência e disposição a ajudar sempre. Merci beaucoup, thank you very much, muchas gracias, muito obrigada!

A todos os pacientes, por me motivarem a cada dia, por permitirem a realização deste estudo e por me proporcionarem grande satisfação e alegria de ter escolhido a medicina como profissão.

NORMATIZAÇÃO 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. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3a ed. (Revisada, Ampliada e Modificada). São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2016;
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

1 SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de fluxogramas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico e etiopatogenia do pênfigo foliáceo	1
1.2	Aspectos clínicos do pênfigo foliáceo	5
1.3	Aspectos diagnósticos do pênfigo foliáceo	7
1.4	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e endogлина (Eng)	8
1.5	Prognóstico e tratamento do pênfigo foliáceo.....	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Gerais	13
2.2	Específicos	13
3	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Casuística de pacientes.....	15
3.1.1	CrITÉRIOS de inclusão	15
3.1.2	CrITÉRIOS de exclusão.....	15
3.1.3	Avaliação dos participantes.....	16
3.2	Materiais e métodos	16
3.2.1	Análise da presença de autoanticorpos pela técnica de imunofluorescência direta e indireta.....	16
3.2.2	Análise do nível sérico de anti-Dsg1, anti-Dsg3, VEGF e sVEGFR-1 pela técnica de ELISA.....	17
3.2.3	Avaliação histopatológica dos fragmentos de pele dos pacientes de pênfigo foliáceo (fase eritrodérmica e não-eritrodérmica), pênfigo vulgar, psoríase e controles saudáveis.....	18

3.2.4	Análise imuno-histoquímica nas amostras de pele dos pacientes de pênfigo foliáceo (fase eritrodérmica e não-eritrodérmica), pênfigo vulgar, psoríase e controles saudáveis.....	18
3.2.4.1	Interpretação manual das reações imuno-histoquímicas.....	19
3.2.4.2	Interpretação computadorizada das reações imuno-histoquímicas ...	20
3.3	Análise estatística.....	20
3.3.1	Análise estatística das variáveis contínuas	21
3.3.2	Análise estatística das variáveis ordinais e categóricas	21
4	RESULTADOS	24
4.1	Análise das variáveis demográficas	24
4.1.1	Dados demográficos e clínicos dos pacientes de pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica	24
4.2	Avaliação do material biológico dos participantes do estudo.....	25
4.2.1	Análise das amostras de soro por meio da técnica de ELISA.....	25
4.2.2	Avaliação imuno-histoquímica da expressão do VEGF e da endogлина ..	28
4.2.2.1	Análise da expressão do VEGF – interpretação manual	28
4.2.2.2	Análise da expressão da endogлина – interpretação manual.....	34
4.2.2.3	Avaliação automatizada do estudo imuno-histoquímico com anti-VEGF e anti-Eng	37
4.2.2.4	Estudo imuno-histoquímico dos depósitos de anticorpos IgG, IgM, IgA e C3 na pele de pacientes com PF eritrodérmico.....	40
5	DISCUSSÃO	44
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	62
7	CONCLUSÕES	64
8	ANEXOS.....	66
8.1	Anexo 1 – Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa.	66
8.2	Anexo 2 – Dados demográficos e laboratoriais dos pacientes de PFE.	68
8.3	Anexo 3 – Dados referentes à internação hospitalar dos pacientes de PFE.	71
9	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i> – Cinase semelhante à activina
AZA	Azatioprina
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CS	Controle saudável
CTC	Corticosteróide
CIC	Ciclosporina
DBA	Doenças bolhosas autoimunes
DDS	Dapsona
Dsg	Desmogleína
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> – Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
Eng	Endoglina
FS	Fogo selvagem
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
HSV	Vírus do herpes simples
IF	Imunofluorescência
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Imuno-histoquímica
IHP	Internação hospitalar
IMD	Imunomodulador
IMS	Imunossupressor

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> – Proteína cinase ativada por mitógeno
MMF	Micofenolato de mofetila
PF	Pênfigo foliáceo
PFE	Pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica
PFNE	Pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica
PIMEC	Pimecrolimo
PSO	Psoríase
PV	Pênfigo vulgar
sVEGFR-1	<i>Soluble vascular endothelial growth factor receptor type 1</i> – receptor solúvel do tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular
TETRA	Tetraciclina
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> – Fator de crescimento transformador β
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> – Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
ZMB	Zona da membrana basal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão das variáveis avaliadas no soro dos pacientes por meio da técnica de ELISA.	27
Tabela 2 – Análise imuno-histoquímica com anti-VEGF na pele de pacientes com PFE e PFNE.	31
Tabela 3 – Avaliação imuno-histoquímica utilizando anti-VEGF nas amostras de pele de pacientes dos grupos controles (PV, PSO e CS).	32
Tabela 4 – Estudo imuno-histoquímico com anti-Eng nas amostras de pele dos pacientes de PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS) – análise manual.	35
Tabela 5 – Análise automatizada da expressão de VEGF nos fragmentos de pele de pacientes com PFE e PFNE e controles (PV, PSO e CS).	38
Tabela 6 – Análise automatizada da expressão de Eng nos espécimes de pacientes de PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO e CS).	39
Tabela 7 – Avaliação IH de IgG, IgM, IgA e C3 na epiderme e zona da membrana basal de amostras de pele de pacientes com PFE.	40
Tabela 8 – Avaliação imuno-histoquímica das células inflamatórias, vasos e anexos utilizando anti-IgG, -IgM, -IgA e -C3.	42
Tabela 9 – Comparação entre as características clínicas, laboratoriais e evolução dos pacientes com PFE publicados na literatura vs. dados do presente estudo.	46
Tabela 10 – IFD vs. IH – comparação entre a detecção dos depósitos de IgG, C3, IgM e IgA na epiderme de pacientes de PFE.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países com PF endêmico.....	2
Figura 2 – Desmossoma.	3
Figura 3 – Manifestações clínicas do PF.....	5
Figura 4 – Eritrodermia no PF.	6
Figura 5 – Imunofluorescência direta no PF.....	7
Figura 6 – Imuno-histoquímica automatizada e patologia digital.	20
Figura 7 – Histopatológico do PF.	25
Figura 8 – Comparação das análises no soro dos pacientes com PFE e PFNE por meio da técnica de ELISA.	26
Figura 9 – Comparação entre os níveis séricos de VEGF no PFE, PFNE e os grupos controles (PV, PSO, CS) por meio da técnica de ELISA.	26
Figura 10 – Correlação entre os níveis séricos do anticorpo anti-Dsg1 e do sVEGFR-1 no PFNE.	27
Figura 11 – Imuno-histoquímica com anti-VEGF no PFE.....	29
Figura 12 – Imuno-histoquímica com anti-VEGF no PFNE.	30
Figura 13 – Imuno-histoquímica com anti-VEGF na pele de pacientes com PV, PSO e CS.	33
Figura 14 – Imuno-histoquímica com anti-Eng no PFE e PFNE.....	34
Figura 15 – Imuno-histoquímica com anti-Eng na pele de pacientes com PV, PSO e CS.	36
Figura 16 – Análise automatizada da positividade por IH.....	37
Figura 17 – Anti-IgG: imunofluorescência direta vs. imuno-histoquímica.	41
Figura 18 – Anti-C3: imunofluorescência direta vs. imuno-histoquímica.	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Kits de VEGF, sVEGFR-1, anti-Dsg1 e -Dsg3 utilizados para análise pela técnica de <i>ELISA</i> no soro dos pacientes com PFE e PFNE e dos indivíduos controles (PV, PSO e CS).	18
Quadro 2 – Relação dos anticorpos primários utilizados na avaliação IH dos espécimes de pele de pacientes de PFE, PFNE, PV, PSO e CS.....	19
Quadro 5 – Avaliação das amostras de soro dos pacientes com PF (fase eritrodérmica e não-eritrodérmica) e dos controles (PV, PSO, CS).	28
Quadro 6 – Análise imuno-histoquímica da expressão do VEGF nos espécimes dos pacientes com PFE, PFNE e dos controles (PV, PSO, CS) – interpretação manual.	33
Quadro 7 – Avaliação imuno-histoquímica da expressão da Eng nos espécimes dos pacientes com PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS) – análise manual.....	36
Quadro 8 – Análise automatizada da expressão do VEGF nos espécimes dos pacientes com PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS).	39
Quadro 9 – Análise automatizada da reação imuno-histoquímica com anti-Eng nas amostras de pele dos pacientes com PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS).	40
Quadro 10 – Avaliação imuno-histoquímica dos depósitos de imunocomplexos (IgG, IgM, IgA e C3) na pele dos pacientes com PF eritrodérmicos.....	42

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Pacientes, materiais e métodos utilizados neste estudo.....	22
Fluxograma 2 – Participação do VEGF e da Eng na patogênese do PFE.....	60

RESUMO

Miyamoto D. *Avaliação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular e da endogлина nos pacientes eritrodérmicos com pênfigo foliáceo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017. 86p.

INTRODUÇÃO: O pênfigo foliáceo (PF) caracteriza-se pela síntese de autoanticorpos contra a desmogleína 1 (Dsg1) com acantólise na epiderme superior. As lesões na face e tronco podem evoluir para eritrodermia (PFE), cuja patogênese é pouco conhecida. Estudos prévios sugerem a participação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da endogлина (Eng). **OBJETIVOS:** Avaliar dados demográficos, expressão tecidual e níveis séricos do VEGF e Eng, bem como o perfil dos imunocomplexos no PFE. **PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram selecionados pacientes de PFE (n=31) e indivíduos controles com pênfigo vulgar (PV; n=10), psoríase (PSO; n=10) e saudáveis (CS; n=14) com amostras de soro e pele armazenadas. Os níveis séricos do VEGF, receptor solúvel do VEGF (sVEGFR-1), anti-Dsg1 e -Dsg3 foram avaliados por meio da técnica de ELISA, e a presença do VEGF, Eng, e imunocomplexos *in situ* foi determinada por imuno-histoquímica (IH) em plataforma automatizada (n=19). Após digitalização das lâminas, a reatividade aos anticorpos supracitados foi classificada manualmente em: 0 (ausente), 1 (discreta-moderada) e 2 (intensa), e analisada por *software*. **RESULTADOS:** PFE ocorreu no início da doença em 25/31 pacientes (80,6%), com média de idade de 42,7 anos e predomínio feminino (23/31; 74,2%). Os pacientes foram hospitalizados em média por 41,2 dias; infecção bacteriana foi a principal complicação (30/31; 96,8%), com bacteremia em 10/31 (32,3%) causada por *Staphylococcus aureus* em 7/10 (70%) dos pacientes. Infecção pelo vírus do herpes simples (HSV) em 11/31 (35,5%) doentes determinou internação prolongada. Valores de imunofluorescência indireta, e anti-Dsg1 e VEGF séricos (ELISA) foram superiores no PFE vs. PF não-eritrodérmico (PFNE) ($p<0,05$). Níveis do sVEGFR-1 foram semelhantes no PFE e PFNE, e correlacionaram-se fracamente com a anti-Dsg1 no PFNE ($p=0,034$). A avaliação manual da IH com anti-VEGF no PFE foi estatisticamente diferente do PFNE ($p=0,042$) e CS ($p=0,004$), e similar ao PV ($p=0,667$) e PSO ($p=0,667$). Já no PFNE, a expressão do VEGF foi estatisticamente diferente do PV ($p=0,049$) e PSO ($p=0,049$) e semelhante ao CS ($p=0,247$). A contagem automatizada dos vasos marcados com anti-Eng no PFE foi similar ao PFNE ($p=0,700$) e PSO ($p=0,133$), e diferente do PV ($p=0,0009$) e CS ($p=0,0009$). A avaliação de 6 espécimes de PFE mostrou depósitos de imunocomplexos: intercelulares intraepidérmicos com IgG e C3 (n=6), IgA (n=5) e IgM (n=1); nas células inflamatórias com IgG e C3 (n=6), IgM e IgA (n=1); nos vasos com IgG, C3 e IgA (n=6), e IgM (n=5); e nos anexos com IgG e C3 (n=6), IgA (n=3) e IgM (n=1). **CONCLUSÕES:** O PFE predomina no início da doença e em mulheres, com maior risco de infecção. O aumento do VEGF sérico e tecidual sugere uma resposta reparadora ao dano tecidual causado pelos níveis elevados de autoanticorpos no PFE. A menor expressão de Eng no PFE indica uma desregulação da angiogênese na eritrodermia. De forma pioneira, a IH automatizada demonstrou a presença de imunocomplexos intraepidérmicos e nas estruturas dérmicas.

Descritores: pênfigo; dermatite esfoliativa; fator A de crescimento do endotélio vascular; moduladores da angiogênese; imuno-histoquímica; técnica direta de fluorescência para anticorpo.

ABSTRACT

Miyamoto D. *Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in erythrodermic patients with pemphigus foliaceus* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017. 86p.

BACKGROUND: Pemphigus foliaceus (PF) is characterized by the production of autoantibodies against desmoglein 1 (Dsg1), triggering superficial acantholysis. Lesions on the face and trunk may evolve to erythroderma (PFE). The pathogenesis of PFE is not fully understood. Previous studies suggest the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endoglin (Eng). **OBJECTIVES:** To evaluate demographic data, VEGF and Eng expression, and immune complexes deposition in patients with PFE. **METHODS:** This study included patients with PFE (n=31) and controls with pemphigus vulgaris (PV; n=10), psoriasis (PSO; n=10), and health individuals (CS; n=14) that had serum and skin samples stored. Serum levels of VEGF, soluble VEGF receptor (sVEGFR-1), anti-Dsg1 and Dsg3 were measured by ELISA, and the *in situ* expression of VEGF, Eng, and immune complexes was evaluated utilizing an automated immunohistochemistry (IH) platform (n=19). After digitalizing the slides, the reactivity was manually classified as 0 (negative), 1 (mild-to-moderate) and 2 (intense), and also analyzed by software. **RESULTS:** PFE occurred at the onset of the disease in 25/31 (80.6%) patients, with a mean age of 42.7 years and a female predominance (23/31; 74.2%). Patients were hospitalized with an average length of stay of 41.2 days. Bacterial infection was the main complication (30/31; 96.8%), with bacteremia in 10/31 (32.3%) due to *Staphylococcus aureus* in 7/10 (70%) patients. Herpes simplex virus infection in 11/31 (35.5%) PFE patients caused prolonged hospitalization. Indirect immunofluorescence titers and serum anti-Dsg1 and VEGF (ELISA) were increased in PFE vs. non-erythrodermic PF (PFNE) ($p<0.05$). Serum levels of sVEGFR-1 were similar in PFE and PFNE, and weakly correlated with anti-Dsg1 in PFNE ($p=0.0342$). Manual analysis of anti-VEGF positivity in PFE was statistically different from PFNE ($p=0.042$) and CS ($p=0.004$), and similar to PSO ($p=0.667$) and PV ($p=0.667$). VEGF expression in PFNE was statistically different from PSO ($p=0.049$) and PV ($p=0.049$) and similar to CS ($p=0.247$). The automated positive vessel count with anti-Eng was similar between PFE and PFNE ($p=0.700$) and PSO ($p=0.133$), but different from PV ($p=0.0009$). Immune complex deposits were evaluated in 6 specimens obtained during PFE and exhibited: intraepidermal intercellular deposits with IgG and C3 (n=6), IgA (n=5) and IgM (n=1); reactivity to inflammatory cells with IgG e C3 (n=6), IgM and IgA (n=1); vascular deposits with IgG, C3 and IgA (n=6), and IgM (n=5); and adnexal positivity with IgG and C3 (n=6), IgA (n=3) and IgM (n=1). **CONCLUSIONS:** Erythroderma predominates at the onset of PF, especially in women, with higher infectious risk. Increased expression of serum and *in situ* VEGF suggests that healing processes are triggered in response to the tissue damage caused by high levels of circulating autoantibodies in PFE. The reduced expression of Eng in PFE demonstrates a dysregulated angiogenesis during erythroderma. To the best of our knowledge, this is the first study that showed intraepidermal and dermal deposits of multiple immune complexes utilizing automated IH analysis.

Descriptors: pemphigus; dermatitis, exfoliative; vascular endothelial growth factor A; angiogenesis modulating agents; immunohistochemistry; fluorescent antibody technique, direct.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Pênfigo compreende o grupo de dermatoses bolhosas autoimunes (DBA) intraepidérmicas que se caracterizam pela produção de autoanticorpos contra as moléculas de adesão intercelulares denominadas desmogleínas (Dsg)¹. Há duas formas principais de pênfigo: o pênfigo foliáceo (PF), que apresenta comprometimento cutâneo exclusivo devido à produção de anticorpos contra a Dsg1, e o pênfigo vulgar (PV), que apresenta duas variantes: a mucosa, em virtude da síntese de anticorpos contra a Dsg3, e a mucocutânea, com produção concomitante de anti-Dsg1².

1.1 Histórico e etiopatogenia do pênfigo foliáceo

O PF foi descrito pela primeira vez em 1844 por Pierre Louis Alphée Cazenave³. A palavra pênfigo deriva do radical grego *pemphix* que significa ar/bolha e a designação foliáceo se refere ao aspecto da descamação superficial e móvel que ocorre na doença⁴. Os mecanismos etiopatogênicos do PF não foram completamente esclarecidos, sendo o desenvolvimento da doença atribuído à combinação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais.

O PF pode ocorrer de forma esporádica ou endêmica, com apresentação clínica e características imunopatológicas semelhantes¹. Por se tratar de uma doença rara, sua incidência real é desconhecida. Estima-se que entre 0,5 a 8/milhão de casos novos de pênfigo ocorram anualmente, e que cerca de um terço desses corresponda ao PF^{2,5}.

A forma esporádica do PF afeta predominantemente adultos na 5ª década de vida, sem predileção por gênero ou raça⁶. A forma endêmica, conhecida como fogo selvagem (FS), ocorre com maior frequência na Colômbia, Paraguai, Venezuela, Peru, Tunísia e principalmente no Brasil^{7,8} onde foram descritos focos com prevalência de até 3,2%⁹. Nessas regiões se observa maior número de casos em crianças, adultos jovens e entre membros da mesma família (Figura 1)⁶.

Figura 1 – Países com PF endêmico ^{7,8}.

Fonte: MapMaker National Geographic.

Os casos de FS no Brasil predominam ao longo de riachos na zona rural do centro-oeste e do sudeste do país, especialmente nos locais com maior concentração de insetos hematófagos. A presença de moradias com paredes de barro e telhado de sapé favorece a instalação desses insetos, constituindo um fator ambiental relevante para o desenvolvimento da doença¹⁰.

Os estudos realizados pelo Grupo Cooperativo pela Pesquisa do Fogo Selvagem contribuíram enormemente para o conhecimento da etiopatogenia do FS. Indivíduos que apresentam antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB1 e que sofrem repetidas picaduras por vetores hematófagos apresentam um risco relativo aumentado de produzir autoanticorpos da classe IgM e IgE dirigidos contra antígenos salivares desses insetos^{11,12}. Em particular, a produção de autoanticorpos contra o antígeno protéico LJM11 das glândulas salivares do flebótomo (*Lutzomyia longipalpis*) pode levar ao reconhecimento da Dsg1 por mimetismo molecular conformacional, através do fenômeno de expansão intermolecular dos epítomos (*epitope spreading*)¹¹.

A Dsg1 é uma glicoproteína transmembranosa da família das caderinas que se distribui preferencialmente nas camadas superiores da epiderme¹³. Cada molécula de Dsg1 apresenta 160k-Da e subdivide-se em 5 ectodomínios (EC)

extracelulares (EC1 a EC5). Indivíduos saudáveis que residem nas áreas endêmicas de FS podem produzir autoanticorpos IgE, IgM e IgG1 anti-Dsg1 que reconhecem o domínio não-patogênico EC5. No entanto, indivíduos geneticamente predispostos são capazes de produzir IgG4 anti-Dsg1 que interage com os domínios patogênicos EC1/EC2 por expansão intramolecular dos epítomos, desenvolvendo o FS¹⁴.

A porção extracelular da Dsg1 estabelece interações homofílicas e heterofílicas com as demais caderinas – Dsg 2 a 4 e desmocollinas 1 a 3 – enquanto seus domínios citoplasmáticos se ligam a placofilinas 1 a 3 e placoglobinas, as quais se conectam às desmoplaquinas, que por sua vez se ligam aos filamentos intermediários do citoesqueleto¹⁵. Esse complexo de proteínas responsáveis pela adesão entre os queratinócitos da epiderme é designado desmossoma^{15,16} (Figura 2).

Figura 2 – Desmossoma.

Legenda: DP – desmoplaquina; Dsc – desmocollina; Dsg – desmogleína; PG – placoglobina; PP – placofilina. (Adaptado de *Dermatology*, 2012, 3ª edição¹⁷).

A ligação entre IgG e Dsg1 promove o desarranjo dos desmossomas situados na porção superior da epiderme¹⁸ levando à perda da adesão entre os queratinócitos, processo conhecido como acantólise. A localização da acantólise nos pênfigos pode ser explicada pela teoria da compensação, segundo a qual o nível da clivagem varia conforme a molécula alvo dos autoanticorpos e sua distribuição ao longo da pele¹⁹. Assim, a ligação entre a IgG do PF e a Dsg1, que possui localização

preferencial nas camadas superiores da pele, promove a formação de uma clivagem na camada subcórnea ou granulosa alta. Não há comprometimento mucoso no PF, pois nessa região há expressão preferencial de Dsg3, que compensa a perda da Dsg1 e possibilita a manutenção de sua integridade¹⁹.

O reconhecimento da Dsg3 pelos autoanticorpos do PV promove a perda da adesão entre os queratinócitos suprabasais, dada a sua distribuição predominante na porção inferior da epiderme. Já nas mucosas, a manutenção da adesão intercelular é mais dependente da Dsg3, que está presente em todo o epitélio, com menor participação da Dsg1. Por essa razão, indivíduos com PV desenvolvem lesões mucosas e, nos casos em que há síntese concomitante de IgG anti-Dsg1, também se observa o comprometimento da pele¹⁹.

As células acantolíticas correspondem aos queratinócitos que perdem a adesão intercelular e tornam-se arredondados, por vezes multinucleados, e com maior relação núcleo-citoplasma, o que lhe confere um aspecto displásico^{20,21}. A acantólise é mediada tanto por mecanismos extracelulares (independentes de sinalização) quanto intracelulares (dependentes de sinalização).

A interação entre a IgG e a Dsg bloqueia a ligação homofílica (Dsg-Dsg) das moléculas de adesão intercelular, em um fenômeno conhecido como estereoidimpedimento (*steric hindrance*)^{22,23}. No PV, esse mecanismo contribui para a acantólise²⁴. Contudo, Waschke et al. demonstraram *in vitro* que a interação homofílica entre as moléculas de Dsg1 pode ser preservada mesmo após sua ligação com a IgG anti-Dsg1²⁵. Tal achado reforça o conceito de que a ativação de vias intracelulares também é necessária para induzir acantólise no PF²⁵.

A acantólise dependente da sinalização intracelular inicia-se com a interação da IgG4 com a Dsg1, que promove a fosforilação da proteína quinase ativada pelo mitógeno p38 (p38 MAPK). A ativação da p38 MAPK desencadeia a retração dos filamentos de queratina e actina responsáveis pela estabilização dos desmossomas. Com a desorganização dos desmossomas ocorre o agrupamento das moléculas de Dsg1²³, fato este que contribui ainda mais para a acantólise no PF⁷. Esse mecanismo também é influenciado pelo repertório de autoanticorpos policlonais produzidos por cada indivíduo com PF. Estudos experimentais demonstram que a combinação de anticorpos monoclonais anti-Dsg1 induz maior retração dos desmossomas em comparação à presença de um único anticorpo monoclonal anti-Dsg1²³.

1.2 Aspectos clínicos do pênfigo foliáceo

No PF, a acantólise traduz-se clinicamente com o surgimento de bolhas flácidas e erosões, que evoluem com descamação e formação de crostas². As lesões podem ocorrer de forma localizada, com predomínio nas áreas fotoexpostas, como a região malar e esternal, e o couro cabeludo. Essa variante do PF apresenta como diagnóstico diferencial o lúpus eritematoso cutâneo¹. Os pacientes podem evoluir com hiperpigmentação residual (Figura 3).

Figura 3 – Manifestações clínicas do PF.

Legenda: (A) Bolha flácida de conteúdo hialino sobre base eritematosa. (B) Bolhas e erosões confluentes em placa com descamação e crostas no abdome e (C) dorso superior. Pênfigo foliáceo localizado com placas eritemato-acastanhadas descamativas no (D) couro cabeludo e na (E) região centro-facial. (F) Hiperpigmentação associada ao pênfigo foliáceo.

O quadro localizado pode remitir, tornar-se crônico, ou evoluir para formas generalizadas, que se manifestam de duas formas principais: invasivo-bolhosa, com acometimento do segmento cefálico, tronco e membros; e eritrodérmica atribuindo-se a denominação de PF eritrodérmico ou eritrodermia esfoliativa^{2,6,26,27} (Figura 4).

Figura 4 – Eritrodermia no PF.

Legenda: Eritema, descamação e crostas difusamente distribuídos na (A) face, (B) tórax e (C) membros inferiores.

A eritrodermia é definida pela presença de eritema e descamação afetando ao menos 90% da superfície corpórea. Essa forma clínica de PF pode ocorrer no início da doença ou durante uma exacerbação. Trata-se de uma manifestação incomum entre as DBA, com elevada morbidade em virtude do alto risco infeccioso associado à intensa perda calórico-proteica e à desregulação da temperatura corporal^{28,29}. Na Tunísia, país onde o PF também é encontrado na forma endêmica, a eritrodermia por PF corresponde a 6,25% dos casos, enquanto em outros países atinge até 2% dos eritrodérmicos³⁰.

Mais raramente, a eritrodermia já foi observada nos pacientes com penfigóide bolhoso. Apenas 10 casos de penfigóide bolhoso eritrodérmico foram descritos³¹⁻³⁵, sendo um deles paciente em acompanhamento no Ambulatório de DBA do Departamento de Dermatologia da Universidade de São Paulo³⁴. O diagnóstico na fase eritrodérmica é desafiador, especialmente na ausência de bolhas, uma vez que a eritrodermia ocorre mais comumente em outras doenças com etiopatogenia distinta, como a psoríase, o eczema, o linfoma cutâneo e as reações medicamentosas^{34,36-38}.

1.3 Aspectos diagnósticos do pênfigo foliáceo

A confirmação do diagnóstico do PF depende de um quadro clínico compatível, associado à presença de clivagem subcórnea ou granulosa alta com células acantolíticas no exame anátomo-patológico, e à demonstração de autoanticorpos depositados na pele ou circulantes²⁶.

Desde 1964, o exame de imunofluorescência (IF) é utilizado para confirmar a presença de autoanticorpos do PF^{26,27} com alta sensibilidade e especificidade³⁹⁻⁴². A pesquisa pode ser feita através de forma direta (IF direta – IFD), na qual um fragmento de pele do paciente é incubado com anticorpo anti-IgG associado à fluoresceína, buscando a presença de anticorpos IgG anti-Dsg1 depositados entre os queratinócitos da epiderme (Figura 5). Para tanto, amostra de pele deve ser mantida em solução salina ou no meio de transporte de Michel a fim de se evitar a degradação dos autoanticorpos⁴³.

Figura 5 – Imunofluorescência direta no PF.

Legenda: (A) Depósitos de IgG entre os queratinócitos da epiderme e ao redor de uma célula acantolítica (seta); clivagem intraepidérmica alta (estrela) – 40x. (B) Fluorescência intercelular intraepidérmica com anti-C3 em área com clivagem alta (estrela) e células acantolíticas (seta) – 40x.

Em 1972, a imuno-histoquímica (IH) começou a ser avaliada como um método alternativo para demonstrar a presença de anticorpos *in situ* em amostras de pele fixadas em formol e embebidas em parafina obtidas de pacientes com DBA⁴⁴. Trata-se de uma técnica consagrada para o diagnóstico e a avaliação de fatores prognósticos de doenças infecciosas, neoplásicas e autoimunes que afetam os

olhos⁴⁵⁻⁴⁷, as mamas⁴⁸, os tratos gastrointestinal⁴⁹, respiratório⁵⁰ e genitourinário⁵¹ e a pele⁵²⁻⁵⁴. A disponibilidade de novos anticorpos e cromógenos, o processamento do espécime em plataformas automatizadas⁵⁵ e a possibilidade de se digitalizar a imagem para análise computadorizada⁵⁶ são algumas das vantagens da IH sobre a IF⁵⁷.

A IH ainda possibilita a análise retrospectiva a partir de material previamente coletado e armazenado dos pacientes com DBA. Frente à raridade das DBA, a realização de estudos prospectivos para investigação da doença se torna difícil. Há poucos dados para avaliar a eficácia da IH em comparação com a IF para o diagnóstico das DBA⁵⁸⁻⁶¹. Portanto, acreditamos ser importante avaliar o papel da IH nas DBA.

Outra maneira de realizar a pesquisa de autoanticorpos é proceder com a IF indireta (IFI), utilizando amostra de soro do doente incubada com prepúcio humano ou esôfago de macaco⁶². Os autoanticorpos circulantes ligam-se entre os queratinócitos do epitélio normal e podem ser subsequentemente demonstrados com anticorpo anti-IgG associado à fluoresceína^{42,62}. Outros métodos para identificar a presença de IgG anti-Dsg incluem a técnica de *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), a imunoprecipitação e o *western blot*^{26,27,63}.

Os títulos de autoanticorpos circulantes podem se correlacionar com a gravidade da manifestação clínica no PF⁶⁴. Entretanto, evidências atuais sugerem que a atividade da doença está relacionada não apenas à ligação entre os anticorpos do PF e a Dsg1, mas também à subsequente expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas.

1.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e endogлина (Eng)

A via de sinalização intracelular relacionada à p38 MAPK que promove acantólise após a interação entre IgG4 e Dsg1 é a mesma via que regula a ativação dos genes responsáveis pela regulação da proliferação e diferenciação celular e pela síntese de citocinas⁶⁵, como o VEGF e a Eng⁶⁶.

O VEGF foi descrito em 1983 por Senger et al. como uma molécula sintetizada por células peritoneais neoplásicas capaz de aumentar a permeabilidade vascular⁶⁷. Posteriormente, além da forma predominante denominada VEGF-A ou simplesmente VEGF, também foram descritas outras quatro glicoproteínas da

mesma família que se ligam aos receptores de VEGF (VEGFR): VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário⁶⁸⁻⁷⁰.

O VEGF é produzido por células neoplásicas, células inflamatórias^{71,72}, plaquetas⁷³⁻⁷⁵ e queratinócitos⁷⁶ por *splicing* alternativo em 4 isoformas, cada qual com 121, 165, 189 e 201 aminoácidos. Dentre elas, o VEGF₁₆₅ exerce maior função biológica. Na pele, o VEGF é produzido pelos queratinócitos após a perda da integridade cutânea e atua nas células endoteliais⁷⁷ estimulando sua proliferação, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular⁷⁸.

Embora a angiogênese seja necessária nas fases iniciais do processo fisiológico de reparação tecidual, o desequilíbrio na expressão de VEGF pode promover efeito oposto, induzindo a hiperproliferação dos queratinócitos e a quimiotaxia de células inflamatórias, como observado nas lesões crônicas de psoríase e de eczema^{68,79}.

Níveis séricos elevados de VEGF foram encontrados em pacientes eritrodérmicos com psoríase e com eczema em comparação a controles saudáveis⁶⁶. Na psoríase, há correlação direta entre os níveis plasmáticos de VEGF, a síntese de VEGF pelos queratinócitos e a gravidade da doença^{80,81}. De modo similar, a expressão aumentada de VEGF na camada córnea da epiderme de pacientes com eczema correlaciona-se com o eritema e edema das lesões e com a gravidade do quadro clínico^{82,83}.

A expressão de VEGFR nos queratinócitos também se encontra aumentada nos doentes com psoríase. Enquanto na pele normal a distribuição dos VEGFR predomina na camada basal, na pele de doentes com psoríase os VEGFR são uniformemente observados nas células epiteliais da camada granulosa à basal⁸⁴.

O VEGFR possui uma forma solúvel, denominada sVEGFR-1, que é sintetizada pelo mesmo gene que codifica o receptor celular VEGFR-1⁸⁵. O sVEGFR-1 apresenta 2 ações principais: pode participar de forma sinérgica da angiogênese mediada pela interação do VEGF com VEGFR-2, promovendo a migração e adesão das células endoteliais; e é capaz de atuar de forma antagônica ao VEGF, ligando-se a esse fator e reduzindo sua biodisponibilidade. Quando a relação entre sVEGFR-1/VEGF encontra-se reduzida, a disponibilidade do VEGF aumenta, possibilitando a disseminação de células tumorais, como demonstrado no melanoma maligno⁸⁶.

Nas DBA também foi demonstrada a elevação do nível sérico de VEGF em pacientes com penfigóide bolhoso e PV em relação a indivíduos saudáveis⁸⁷. Muito embora a eritrodermia seja mais frequente no PF, a expressão do VEGF nesses pacientes ainda não havia sido estudada. Tendo em vista que o VEGF participa da patogênese da eritrodermia e encontra-se aumentado nos pacientes com DBA, nosso grupo considerou relevante avaliar o VEGF sérico e tecidual nos pacientes com PF, especialmente durante a eritrodermia.

Com a proliferação vascular induzida pelo VEGF, também seria esperado encontrar alteração da expressão da Eng, outro marcador de angiogênese^{88,89}. Esta glicoproteína transmembranosa é um co-receptor do fator transformador do crescimento (TGF)- β 1 e - β 3 presente principalmente nas células endoteliais^{90,91}.

A Eng pode formar um complexo com dois receptores distintos de TGF- β 1 e que possuem ações antagônicas⁸⁸. Por um lado, a ligação da Eng com a quinase semelhante à ativina tipo 1 (ALK-1) promove ativação da via intracelular mediada por SMAD 1 ou 25, que estimula a proliferação dos queratinócitos e a angiogênese. Por outro, a interação entre Eng e a quinase semelhante à ativina tipo 5 (ALK-5) estimula a sinalização intracelular mediada por SMAD 2 e 23, que culmina na inibição da multiplicação celular⁸⁹.

A expressão aumentada de Eng contribui para o desenvolvimento de lesões de psoríase, possivelmente por perda da inibição à proliferação dos queratinócitos e aumento da permeabilidade vascular a células inflamatórias⁹². Em relação às DBA, ainda não foi demonstrada a presença de Eng. Consideramos igualmente relevante avaliar a expressão de Eng na pele dos pacientes com PF.

1.5 Prognóstico e tratamento do pênfigo foliáceo

A mortalidade dos pacientes por pênfigo atingia 50% em 2 anos a até 100% em 5 anos⁹³ na era pré-corticoterapia sistêmica. O número de óbitos atribuídos à doença reduziu substancialmente após a introdução desta medicação sistêmica (5-10%), mas, houve aumento da morbidade devido às complicações advindas do seu uso prolongado, tais como: diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, osteopenia/osteoporose, distúrbios psiquiátricos e infecções⁹⁴.

Com o intuito de reduzir a dose e a duração do tratamento com corticosteróides, medicamentos imunossupressores e imunomoduladores foram

associados ao tratamento do PF, contribuindo para um controle melhor da doença⁹⁵. No entanto, a imunossupressão decorrente tanto do uso dos corticosteróides quanto dos imunossupressores aumentou a ocorrência de infecções secundárias comuns da pele e de infecções oportunistas⁹⁶.

A necessidade de um tratamento mais específico para o pênfigo motivou a utilização dos imunobiológicos, sendo o principal deles o rituximabe. Trata-se de um anticorpo monoclonal quimérico com especificidade para o receptor CD20 presente nos linfócitos B precoces até sua diferenciação em células plasmáticas maduras⁹⁷. Uma vez que as células tronco não expressam CD20, a produção de linfócitos B é preservada e reconstituída após 6 meses do tratamento com rituximabe⁹⁸. Assim, os linfócitos B autorreativos são destruídos e substituídos por linfócitos B *naive*⁹⁹.

O uso do rituximabe no tratamento do pênfigo teve início em 2001¹⁰⁰. Desde então, um número crescente de casos e de estudos prospectivos multicêntricos a respeito da eficácia do rituximabe tem sido publicado com enfoque nos benefícios de sua utilização tais como controle mais prolongado da doença, com menor dose diária e dose acumulada de corticosteróide sistêmico¹⁰¹. Contudo, o perfil de segurança a longo prazo, a maior incidência de infecções e o custo da medicação ainda restringem sua indicação a pacientes com formas graves de pênfigo e refratárias a outros tratamentos^{102,103}.

De 1844 até hoje, o conhecimento sobre os mecanismos que promovem a formação das lesões no PF ampliou-se muito, contribuindo para o uso de novas drogas para o tratamento dos pacientes. Porém, o processo de reparação tecidual no PF ainda não foi avaliado e seu entendimento pode contribuir para uma nova abordagem terapêutica desses pacientes, com ênfase na redução da síntese de autoanticorpos e na otimização da cicatrização cutânea.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Este estudo teve por objetivo avaliar os dados demográficos, expressão tecidual e níveis séricos do VEGF e da Eng, bem como o perfil dos imunocomplexos no PFE.

2.2 Específicos

1. Analisar os dados demográficos, duração da internação hospitalar e complicações observados na fase eritrodérmica em pacientes de PF.
2. Avaliar os níveis circulantes de anticorpos IgG anti-Dsg por meio da técnica de IFI dos pacientes com PF tanto na fase eritrodérmica quanto na fase não-eritrodérmica.
3. Analisar por *ELISA* os níveis séricos do VEGF, sVEGFR-1, anti-Dsg1 e anti-Dsg3 dos pacientes de PF, tanto na fase eritrodérmica, quanto na fase não-eritrodérmica.
4. Estudar as fases eritrodérmica e não-eritrodérmica do PF quanto à expressão tecidual do VEGF e da Eng através da técnica de IH.
5. Comparar os pacientes de PF em sua fase eritrodérmica e não-eritrodérmica com os indivíduos saudáveis (CS) e com os pacientes pênfigo vulgar (PV) e com psoríase (PSO) tanto em relação aos níveis séricos do VEGF e do sVEGFR-1, quanto à expressão tecidual do VEGF e da Eng.
6. Comparar a detecção da presença de imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e de complemento (C3) depositado na pele dos pacientes com PF pela técnica de IH com a FD.

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística de pacientes

3.1.1 Critérios de inclusão

O presente estudo foi observacional, retrospectivo e longitudinal, com a inclusão de pacientes com o diagnóstico de PF e que apresentaram pelo menos 1 episódio de eritrodermia durante a evolução da doença, no período entre janeiro de 1991 e dezembro de 2015. Os participantes foram selecionados no Ambulatório de DBA do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O diagnóstico de PF foi confirmado através do exame clínico, histopatológico, e IFD e/ou IFI.

Pacientes com o diagnóstico de PV e de PSO em placas foram incluídos como controles positivos; observaram-se os seguintes critérios: presença de doença ativa; idade, gênero e topografia da biópsia semelhantes a dos indivíduos com PF; biópsia prévia com exame histopatológico compatível com o diagnóstico da doença e amostra de soro armazenada. Os CS foram selecionados a partir de doadores de fragmentos de pele normais e de amostras de soro de indivíduos saudáveis. As amostras utilizadas no estudo encontravam-se no biobanco do Laboratório de Dermatopatologia e do Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia HCFMUSP.

Por se tratar da análise retrospectiva em material humano previamente armazenado, o sigilo dos doentes foi mantido de acordo com a declaração de confidencialidade aprovada pela Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (número do parecer: 107.470) (Anexo 1).

3.1.2 Critérios de exclusão

Excluíram-se os pacientes que não apresentavam confirmação da eritrodermia nos registros dos prontuários médicos e que não possuíam material biológico armazenado.

3.1.3 Avaliação dos participantes

As amostras de soro coletadas dos doentes com PF na fase eritrodérmica e na fase não eritrodérmica (PFNE) e dos controles, armazenados a -70°C, foram analisadas. Foram utilizados para o estudo fragmentos de pele previamente fixados em formol e embebidos em parafina, obtidos dos indivíduos com PFE e PFNE; dos pacientes com PV e com PSO durante a fase ativa da doença, e dos CS.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Análise da presença de autoanticorpos pela técnica de imunofluorescência direta e indireta

Todos os pacientes com PF incluídos no estudo tiveram seu diagnóstico confirmado por IFD e IFI. O estudo de IFD foi realizado em fragmentos de pele criopreservados em meio de Michel, seccionados com criostato em cortes com 4 µm de espessura dispostos em lâminas silanizadas. Cada amostra foi incubada por 30 minutos em câmara úmida (temperatura ambiente) com os conjugados contendo anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C3 humana (Dako, Dinamarca) com fluoresceína tiocianato (FITC, Sigma Aldrich, EUA) diluídos em Azul de Evans (1/30).

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBS (*Tris-buffered saline* com cálcio; pH 7,5) por 20 minutos, e cobertas por glicerina tamponada (pH 8,5 a 9,0) e lamínula de vidro. A leitura das lâminas foi realizada no microscópio de fluorescência (HBO 502; Carl Zeiss, Alemanha), com ocular de 10x e objetivas de 16x e 40x, para a avaliação da presença de fluorescência intercelular intraepidérmica, na zona da membrana basal e/ou estruturas dérmicas.

Para a detecção de autoanticorpos circulantes por IFI, amostras de soro coletadas dos pacientes com PF e preservadas a -70°C foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas a diluição seriada em TBS a partir de 1:1520. Cada diluição foi incubada com fragmentos de pele de prepúcio humano com 4 µm de espessura por 60 minutos, seguida por 2 lavagens com solução tampão TBS (*Tris-buffered saline* com cálcio; pH 7,5) por 20 minutos cada.

Os imunocomplexos formados foram revelados com os conjugados de fluoresceína tiocianato (FITC, Sigma Aldrich, EUA) com anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e

anti-C3 humana (Dako, Dinamarca) por 30 minutos. Após 2 lavagens com TBS por 20 minutos cada, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 8,5 a 9,0) e lamínula de vidro. Para leitura no microscópio de fluorescência (HBO 502; Carls Zeiss, Alemanha) com ocular de 10x e objetivas de 16x e 40x para a avaliação da presença de fluorescência intercelular intraepidérmica,

3.2.2 Análise do nível sérico de anti-Dsg1, anti-Dsg3, VEGF e sVEGFR-1 pela técnica de ELISA

O soro dos pacientes com PF obtido na fase eritrodérmica e na fase não-eritrodérmica e as amostras coletadas dos pacientes com PV, PSO e CS foram avaliados através da técnica de *ELISA* sanduíche, conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Foram quantificados os níveis séricos de VEGF, sVEGFR-1 de todos os participantes e de anti-Dsg-1 e anti-Dsg-3 dos pacientes com PF e PV (Quadro 1).

Para a avaliação do nível sérico do VEGF, alíquotas de 100 µL de solução padrão, controle e de amostras de soro foram adicionadas a uma placa recoberta com anticorpo monoclonal anti-VEGF humano com 100 µL da solução diluente. Após incubação por 2 horas em temperatura ambiente, cada poço foi submetido a 3 lavagens com 400 µL do tampão de lavagem, seguido pela adição de 200 µL de conjugado humano VEGF mantido por 2 horas em temperatura ambiente.

Cada poço foi novamente lavado 3 vezes com 400 µL do tampão de lavagem para a adição de 200 µL da solução substrato. Após 25 minutos sob proteção da luz, 50 µL da solução de parada foram colocados em cada poço para posterior leitura da placa a 450nm e 540nm. Com os valores das densidades ópticas obtidos para a solução padrão e controles, a curva da concentração do VEGF (pg/mL) foi determinada, a partir da qual foi calculado o nível do VEGF presente em cada amostra.

Os níveis séricos de sVEGFR-1, anti-Dsg1 e anti-Dsg3 foram avaliados com um protocolo semelhante ao empregado para a dosagem do VEGF circulante, utilizando uma placa recoberta com anticorpo monoclonal anti-VEGFR-1 humano, Dsg1 e Dsg3 respectivamente.

Quadro 1 – Kits de VEGF, sVEGFR-1, anti-Dsg1 e -Dsg3 utilizados para análise pela técnica de *ELISA* no soro dos pacientes com PFE e PFNE e dos indivíduos controles (PV, PSO e CS).

ANTICORPO	MARCA	CÓDIGO	ENSAIO	REFERÊNCIA
VEGF*	R&D Systems	DVE00	quantitativo (<i>sandwich</i>)	220 pg/mL
sVEGFR-1	R&D Systems	DVR100B	quantitativo (<i>sandwich</i>)	75-179 pg/mL
Desmoglein 1 48 (IgG)	Euroimmun	EA 1495-4801 G	quantitativo (<i>sandwich</i>)	> 20 pg/mL
Desmoglein 3 48 (IgG)	Euroimmun	EA 1496-4801	quantitativo (<i>sandwich</i>)	> 20 pg/mL

Legenda: VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; sVEGFR-1 – receptor solúvel do tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular.

* O kit de *ELISA* utilizado para detecção do VEGF circulante reconhece a isoforma predominante em humanos (VEGF₁₆₅)

3.2.3 Avaliação histopatológica dos fragmentos de pele dos pacientes de pênfigo foliáceo (fase eritrodérmica e não-eritrodérmica), pênfigo vulgar, psoríase e controles saudáveis.

A avaliação histopatológica das amostras de pele foi realizada através da coloração de hematoxilina-eosina (HE) e da IH utilizando os anticorpos primários anti-VEGF, -Eng, -IgG, -IgM, -IgA, -C3.

3.2.4 Análise imuno-histoquímica nas amostras de pele dos pacientes de pênfigo foliáceo (fase eritrodérmica e não-eritrodérmica), pênfigo vulgar, psoríase e controles saudáveis.

As reações IH foram realizadas no Laboratório de Patologia Ocular da Universidade McGill (MUHC-McGill University Ocular Pathology Laboratory), em Montreal (Canadá), sob a supervisão do Prof. Dr. Miguel N. Burnier Jr.

Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir dos fragmentos de pele fixados em formol e embebidos em parafina dos participantes do estudo. A avaliação IH foi realizada na plataforma automatizada Ventana Benchmark

LT® Automated Platform (Ventana Medical Systems, Inc.; Tucson, AZ, EUA) (Figura 6) de acordo com o protocolo do fabricante, que inclui: desparafinização, condicionamento celular e recuperação antigênica com CC1 (tampão Tris-EDTA pH 8,0), seguidos pela digestão enzimática com protease alcalina por 4 minutos.

Os anticorpos primários foram incubados por 32 minutos a 37°C; as especificações de cada anticorpo, sua respectiva concentração e o controle positivo usado em cada experimento encontram-se detalhados no Quadro 2. Os clones dos anticorpos primários anti-IgG, -IgA, -IgM e -C3 foram selecionados com base nos anticorpos empregados para o estudo de IFD. Anti-VEGF e anti-Eng foram visualizados utilizando o cromógeno vermelho Fast Red; anti-IgG, -IgA, -IgM e -C3 foram evidenciados através do cromógeno marrom UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tucson, AZ, EUA). Todas as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e reagente azulado por 4 minutos cada e montadas com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

Quadro 2 – Relação dos anticorpos primários utilizados na avaliação IH dos espécimes de pele de pacientes de PFE, PFNE, PV, PSO e CS.

ANTICORPO	ORIGEM	MARCA (CÓDIGO)	DILUIÇÃO	CONTROLE	CROMÓGENO
Anti-VEGF*	Coelho	Santa Cruz (SC-152)	1:500	fígado	Fast Red
Anti-Eng	Camundongo	Dako (MK3527)	1:300	placenta	Fast Red
Anti-IgG	Coelho	Dako (A0423)	1:20000	amígdala	DAB
Anti-IgM	Coelho	Dako (A0425)	1:5000	amígdala	DAB
Anti-IgA	Coelho	Dako (A0262)	1:3000	amígdala	DAB
Anti-C3	Coelho	Dako (A0062)	1:5000	rim	DAB

Legenda: Fast Red – cromógeno vermelho; DAB – cromógeno marrom

* O anticorpo anti-VEGF utilizado reconhece a isoforma predominante em humanos (VEGF₁₆₅)

3.2.4.1 Interpretação manual das reações imuno-histoquímicas

A análise das reações IH foi realizada em todo o corte histológico, que foi dividido em 4 porções: epiderme, células inflamatórias, vasos e anexos. Para cada uma delas, a positividade à IH foi classificada em 0 (ausente), 1 (discreta-moderada) e 2 (intensa).

3.2.4.2 Interpretação computadorizada das reações imuno-histoquímicas

Cada espécime avaliado com anti-VEGF e anti-Eng foi digitalizado através do escâner digital de lâminas ScanScope AT Turbo (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), utilizando o aumento de 40x (Figura 6). A positividade com anti-VEGF foi avaliada com o programa Aperio ImageScope no modo de contagem de *pixel* (*Positive pixel count algorithm*; Leica Biosystems Imaging, Inc.; Nussloch, Alemanha). A positividade com anti-Eng foi quantificada com o mesmo programa no modo de análise automatizada de microvasos (*Automated microvessel analysis v1 algorithm*; Leica Biosystems Imaging, Inc.; Nussloch, Alemanha).

Figura 6 – Imuno-histoquímica automatizada e patologia digital.

Legenda: (A) Plataforma de imuno-histoquímica automatizada Ventana Benchmark LT®. (B) Escâner digital Aperio ScanScope AT turbo. Fonte: Roche® e Leica Biosystems®.

3.3 Análise estatística

Foram calculados a média e o desvio-padrão das variáveis demográficas, do nível sérico de VEGF e de sVEGFR-1, e dos anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3. As análises foram realizadas com o programa de estatística *GraphPadPrism* versão 7.0 para *Mac OS X* (*GraphPad software*, San Diego, CA, EUA). O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3.3.1 Análise estatística das variáveis contínuas

As variáveis contínuas (nível sérico do VEGF, sVEGFR-1, anti-Dsg1, anti-Dsg3) do PFE e do PFNE foram comparadas entre si e com os grupos controle (PV, PSO, CS). O teste *t-Student* foi utilizado para as variáveis com distribuição normal e o teste não-paramétrico Mann-Whitney foi empregado para os valores sem distribuição normal.

3.3.2 Análise estatística das variáveis ordinais e categóricas

Os títulos de IFI (variáveis ordinais) e as variáveis categóricas relativas à análise manual da reação IH com anti-VEGF foram comparadas entre o PFE e o PFNE e com os grupos controle (PV, PSO, CS) através do teste qui-quadrado. A positividade da IH foi classificada em 0 quando negativa, 1 se discreta a moderada e 2 para intensa em cada uma das seguintes regiões da pele: epiderme, células inflamatórias, vasos e anexos.

Foram calculados os escores das amostras a partir da multiplicação dos valores obtidos em cada uma das seguintes regiões presentes em todos os fragmentos (epiderme, células inflamatórias e vasos). Uma vez que nem todas as amostras tinham representação dos anexos, a positividade nessas regiões não pôde ser comparada entre os grupos e por isso não foi incluída no cálculo do escore. Os resultados finais obtidos (mínimo = 0 e máximo = 8) foram classificados em marcação discreta quando o escore foi de 0 a 1 e marcação intensa de 2 a 8. Esta divisão foi adotada com base na descrição da presença de VEGF na epiderme¹⁰⁴ e nos vasos da pele normal¹⁰⁵, conferindo a ela um escore 1.

A seleção da casuística e os materiais e métodos utilizados neste estudo encontram-se resumidos no fluxograma 1.

Fluxograma 1 – Pacientes, materiais e métodos utilizados neste estudo

Legenda: CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa; CS – controle saudável; DBA – dermatoses bolhosas autoimunes; HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; PSO – psoríase; PV – pênfigo vulgar; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; sVEGFR-1 – receptor solúvel do tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise das variáveis demográficas

Os prontuários de todos os pacientes com diagnóstico de PF (n=180) acompanhados no período entre janeiro de 1991 e dezembro de 2015 no Ambulatório de DBA do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP foram revisados. Dentre os 180 pacientes com PF, 31 (17,2%) se adequaram aos critérios de inclusão do estudo.

4.1.1 Dados demográficos e clínicos dos pacientes de pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica

Dos 31 pacientes com PFE incluídos no estudo, 23 (74,2%) eram do sexo feminino e 8 (25,8%) do sexo masculino, com idade entre 5 e 72 anos (média 42,7 anos). Houve predomínio da cor de pele branca (16F; 5M) em relação à pele parda (5F:1M) e à pele negra (2F; 2M).

A eritrodermia foi a manifestação clínica inicial do PF em 25/31 (80,6%) pacientes. O exame histopatológico e a IFD foram realizados na vigência da eritrodermia em 28/31 casos. Observou-se a presença de acantólise subcórnea ou granulosa em 92,9% (26/28) das amostras, enquanto que 7,1% (2/28) exibiram pústula espongiforme (Figura 7).

À IFD foram encontrados depósitos de IgG intercelulares intraepidérmicos em 100% (28/28) dos casos e de C3 com o mesmo padrão fluorescente em 85,7% (24/28) dos pacientes de PF. Na zona da membrana basal (ZMB) houve depósito de C3 (7/28 – 25%), IgM (4/28 – 14,3%) e de IgA (1/28 – 3,6%) das amostras (Anexo 2).

Todos os pacientes eritrodérmicos foram hospitalizados para tratamento do PFE e para compensação clínica, com duração média da internação de 41,2 dias (6-190 dias) (Anexo 3).

A complicação mais frequente durante o PFE foi a infecção bacteriana secundária da pele, que ocorreu em 30/31 (96,8%) pacientes, dos quais 10/31 (32,3%) evoluíram com infecção de corrente sanguínea. O *Staphylococcus aureus* foi identificado na hemocultura de 7/10 (70%) pacientes com bacteremia.

Figura 7 – Histopatológico do PF.

Legenda: (A) Clivagem intraepidérmica subcórnea com células acantolíticas - 20x; (B) Células acantolíticas na camada granulosa - 40x. (C) Acanbólise no folículo piloso - 20x; (D) Células acantolíticas no folículo piloso - 40x.

Outra infecção observada foi a erupção variceliforme de Kaposi causada pelo vírus do herpes simples (HSV), que ocorreu em 11/31 (35,5%) dos pacientes eritodérmicos, levando a um período de internação hospitalar mais prolongado, quando comparados aos não infectados pelo HSV ($p=0,01$). Não houve nenhum óbito, a despeito das complicações infecciosas.

4.2 Avaliação do material biológico dos participantes do estudo

4.2.1 Análise das amostras de soro por meio da técnica de ELISA

Tanto os títulos de IgG anti-Dsg1 por IFI ($p<0,0001$) quanto os níveis dos anticorpos anti-Dsg1 por ELISA ($p=0,0026$) foram maiores na fase eritodérmica do que na fase não-eritodérmica (Figura 8). Apenas 1 doente apresentou anticorpo anti-Dsg3 positivo na fase eritodérmica (39,46; >20).

Os níveis séricos de VEGF dos pacientes com PFE foram superiores em relação ao PFNE ($p=0,01$) e aos CS ($p=0,0001$) (Figura 9). Não se observou diferença nos níveis séricos de VEGF entre os pacientes com PFE e os indivíduos com PV ($p=0,07$) e PSO ($p=0,46$). Em relação ao sVEGFR-1, não houve diferença na sua expressão entre o PFE e o PFNE ($p=0,50$) (Figura 8). A expressão de sVEGFR-1 foi menor nos pacientes com PFE em relação aos grupos PV ($p=0,02$), PSO ($p=0,0001$) e CS ($p=0,02$) (Tabela 1).

Figura 8 – Comparação das análises no soro dos pacientes com PFE e PFNE por meio da técnica de ELISA.

Legenda: PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica. Níveis séricos de anti-Dsg1, VEGF, sVEGFR-1 em pg/mL. As linhas representam a média com desvio padrão; * $p \leq 0,05$.

Figura 9 – Comparação entre os níveis séricos de VEGF no PFE, PFNE e os grupos controles (PV, PSO, CS) por meio da técnica de ELISA.

Legenda: CS – controle saudável; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; PSO – psoríase; PV – pênfigo vulgar. Aumento dos níveis séricos de VEGF nos pacientes com PFE em comparação aos pacientes com PFNE e CS. As linhas representam a média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão das variáveis avaliadas no soro dos pacientes por meio da técnica de ELISA.

Anticorpo	PFE		PFNE		PV		PSO		CS	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Anti-Dsg1	210,7	44,8	92,4	96,0	139,1	115,4	NR		NR	
Anti-Dsg3	0		(1 doente: 39,46)		179,4	63,5	NR		NR	
VEGF	552,4	324,0	308,3	239,6	1011,0	825,7	400,7	156,6	193,5	134,5
sVEGFR-1	53,9	78,9	46,0	78,3	64,1	47,1	67,8	62,2	155,6	43,5

Legenda: CS – controle saudável; DP – desvio padrão; Dsg – desmogleína; NR – não realizado; PFE – pêfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pêfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; PSO – psoríase; PV – pêfigo vulgar; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; sVEGFR-1 – receptor de VEGF solúvel..

Avaliando-se a relação entre as variáveis VEGF, sVEGFR-1, anticorpo anti-Dsg1 e IFI nas duas fases do PF, houve correlação fraca somente dos níveis de sVEGFR-1 e de anticorpo anti-Dsg1 ($r=0,4249$; $p=0,0342$) no PFNE (Figura 10).

Figura 10 – Correlação entre os níveis séricos do anticorpo anti-Dsg1 e do sVEGFR-1 no PFNE.

Quadro 5 – Avaliação das amostras de soro dos pacientes com PF (fase eritrodérmica e não-eritrodérmica) e dos controles (PV, PSO, CS).

- Os títulos de IFI e os níveis de anti-Dsg1 e do VEGF circulantes (*ELISA*) encontraram-se aumentados no PFE em relação ao PFNE.
- Os níveis séricos de sVEGFR-1 foram semelhantes no PFE e PFNE.
- Os níveis séricos de sVEGFR-1 e do anticorpo anti-Dsg1 apresentaram correlação fraca no PFNE.

4.2.2 Avaliação imuno-histoquímica da expressão do VEGF e da endoglin

4.2.2.1 Análise da expressão do VEGF – interpretação manual

As amostras de pele avaliadas por IH com anti-VEGF foram divididas em 4 regiões: epiderme, células inflamatórias, vasos e anexos. Cada uma dessas áreas foi analisada quanto à positividade da marcação IH, classificada como negativa (0), discreta a moderada (1) ou intensa (2).

Multiplicamos os valores atribuídos a cada região (epiderme, células inflamatórias e vasos) para obter um escore, que foi utilizado para a comparação das fases do PF (eritrodérmica e não-eritrodérmica) entre si e com os grupos controle (PV, PSO e CS). Os anexos foram excluídos desse cálculo a fim de evitar que o resultado final fosse subestimado nas amostras onde os mesmos não foram representados. Consideramos os escores 0 e 1 como normais, uma vez que a pele normal pode expressar VEGF na epiderme¹⁰⁴ e nos vasos¹⁰⁵, e acima de 2 como alterados.

Durante o PFE, todos os fragmentos de pele (n=19) apresentaram VEGF positivo na epiderme, sendo 2 de forma leve e 17 de forma intensa. Além disso, observamos positividade leve (n=2) e intensa (n=15) nas células inflamatórias. O anti-VEGF também marcou os vasos de maneira intensa em 15 pacientes e de forma leve em 3 pacientes. Os anexos foram positivos para anti-VEGF em 16

pacientes, sendo 15 com marcação intensa e 1 com marcação leve (Figura 11; Tabela 2).

Figura 11 – Imuno-histoquímica com anti-VEGF no PFE.

Legenda : (A) Clivagem intraepidérmica alta preenchida por polimorfonucleares (estrela), com positividade intensa dos queratinócitos e das células inflamatórias e endoteliais da derme superior – 20x. (B) Acanbólise subcórneia (estrela) com positividade intensa dos queratinócitos e das células inflamatórias e vasos subjacentes – 40x. (C) Positividade intensa dos vasos e discreta (seta pontilhada) a intensa dos anexos (seta cheia) – 30x. (D) Positividade intensa da glândula sebácea – 40x.

Nos 17 pacientes com amostras representativas do período não-eritrodérmico, encontramos positividade na epiderme em 16/17 fragmentos (leve em 6; intensa em 10). Em relação às células inflamatórias, o anti-VEGF foi levemente positivo em 12/17 pacientes (leve em 4; intensa em 8). Houve positividade nos vasos em 14/17 pacientes (leve em 6; intensa em 8), e nos anexos em 12/17 pacientes (leve em 4; intensa em 8) (Figura 12; Tabela 2).

Figura 12 – Imuno-histoquímica com anti-VEGF no PFNE.

Legenda: (A) Positividade intensa dos queratinócitos epidérmicos, das células inflamatórias e dos vasos da derme superficial – 20x, (B) no maior aumento – 40x. (C) Positividade discreta a intensa das glândulas sudoríparas e das células endoteliais – 20x. (D) Positividade discreta dos queratinócitos do folículo piloso e intensa das células inflamatórias e endoteliais – 20x.

A expressão tecidual do VEGF no PFE foi diferente do PFNE ($p=0,042$; $IC=0,90-18,95$). A diferença entre as duas fases manteve-se quando comparamos a intensidade da marcação na epiderme ($p=0,034$; $IC=1,16-31,04$), nas células inflamatórias ($p=0,0467$; $IC=0,93-14,9$) e nos vasos ($p=0,0467$; $IC=0,93-14,9$).

A comparação entre as fases eritrodérmica e não-eritrodérmica no mesmo indivíduo foi possível em 11 pacientes que apresentavam amostras de pele coletadas em ambos períodos. Não houve diferença na expressão do VEGF ($p=0,0555$; $IC=1-106,1$).

Tabela 2 – Análise imuno-histoquímica com anti-VEGF na pele de pacientes com PFE e PFNE.

PFE						PFNE					
Paciente	E	I	V	A	ESCORE	Paciente	E	I	V	A	ESCORE
PF-2	2	1	1	1	2	PF-1	2	0	1	2	0
PF-3	1	1	1	NR	1	PF-2	1	1	1	1	1
PF-4	2	0	1	2	0	PF-3	2	2	2	2	8
PF-6	2	2	2	2	8	PF-7	1	1	1	1	1
PF-7	2	2	2	2	8	PF-8	2	2	2	2	8
PF-9	2	2	2	2	8	PF-12	2	2	2	2	8
PF-10	2	2	2	2	8	PF-13	2	2	2	NR	8
PF-13	2	2	2	2	8	PF-14	2	2	2	2	8
PF-14	2	2	2	2	8	PF-17	2	2	2	2	8
PF-15	2	2	2	2	8	PF-18	2	2	2	0	8
PF-16	2	2	2	2	8	PF-19	0	0	0	0	0
PF-17	2	2	2	0	8	PF-21	1	1	1	1	1
PF-21	2	2	2	2	8	PF-23	2	1	1	2	2
PF-22	1	0	0	0	0	PF-26	1	0	1	1	0
PF-23	2	2	2	2	8	PF-27	2	2	2	2	8
PF-26	2	2	2	2	8	PF-28	1	0	0	NR	0
PF-27	2	2	2	2	8	PF-31	1	0	0	0	0
PF-29	2	2	2	2	8						
PF-31	2	2	2	2	8						

Legenda: A – anexos; E – epiderme; I – células inflamatórias; NR – não representado; PF – pêndigo foliáceo; PFE – pêndigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pêndigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; V – vasos. ESCORE – multiplicação da intensidade da marcação imuno-histoquímica na epiderme, nas células inflamatórias e nos vasos (E x I x V);.

Nos 10 pacientes com PV, observou-se positividade na epiderme em todas as amostras, sendo em 9 de forma intensa e em 1 de forma leve. As células inflamatórias foram positivas com anti-VEGF em 9 pacientes (1 leve; 8 intensa) e os vasos foram positivos em todas as amostras, 2 com marcação leve e 8 com marcação intensa. Em 7 fragmentos foi possível avaliar os anexos, que também se mostraram positivos, com 1 amostra com marcação leve e 6 com marcação intensa (Tabela 3; Figura 13). Ao comparamos os pacientes com PF com os pacientes com

PV, houve diferença somente em relação à fase não eritrodérmica do PF ($p=0,0485$; $IC=0,01-1,112$).

Tabela 3 – Avaliação imuno-histoquímica utilizando anti-VEGF nas amostras de pele de pacientes dos grupos controles (PV, PSO e CS).

Paciente	E	I	V	A	ESCORE	Paciente	E	I	V	A	ESCORE	Paciente	E	I	V	A	ESCORE
PV-1	2	2	2	2	8	PSO-1	2	2	2	2	8	CS-1	1	0	1	0	0
PV-2	2	2	2	2	8	PSO-2	2	2	2	2	8	CS-2	2	2	2	2	8
PV-3	2	2	2	2	8	PSO-3	2	2	2	2	8	CS-3	1	0	0	NR	0
PV-4	2	2	2	NR	8	PSO-4	2	2	2	2	8	CS-4	2	1	1	1	2
PV-5	2	2	2	2	8	PSO-5	2	2	2	2	8	CS-5	2	1	1	1	2
PV-6	2	2	2	2	8	PSO-6	2	2	2	2	8	CS-6	1	0	0	NR	0
PV-7	2	2	2	2	8	PSO-7	2	2	2	2	8	CS-7	1	0	0	0	0
PV-8	2	1	1	NR	2	PSO-8	2	2	2	NR	8	CS-8	0	0	0	0	0
PV-9	2	2	2	NR	8	PSO-9	2	2	2	NR	8	CS-9	1	0	0	0	0
PV-10	1	0	1	1	0	PSO-10	1	1	1	1	1	CS-10	1	0	0	0	0

Legenda: A – anexos; CS – controle saudável; E – epiderme; I – células inflamatórias; NR – não representado; PSO – psoríase; PV – pênfigo vulgar; V – vasos. ESCORE – multiplicação da intensidade da marcação imuno-histoquímica na epiderme, nas células inflamatórias e nos vasos ($E \times I \times V$).

Os 10 pacientes com PSO apresentaram positividade em todas as regiões analisadas (epiderme, células inflamatórias, vasos e anexos), sendo 1 de forma leve e 9 de forma intensa (Tabela 3; Figura 13). Em relação aos pacientes com PF, observamos diferença apenas na fase não-eritrodérmica do PF ($p=0,0485$; $IC=0,01-1,112$), que se manteve ao avaliarmos isoladamente as células inflamatórias ($p=0,0257$; $IC=0,008-0,86$) e os vasos ($p=0,0257$; $IC=0,008-0,86$).

Os CS também exibiram positividade com anti-VEGF na epiderme (6 leve; 3 intensa), nas células inflamatórias (2 leve; 1 intensa), nos vasos (3 leve; 1 intensa) e nos anexos (2 leve; 1 intensa) (Tabela 3; Figura 13). Quando comparamos os escores de VEGF entre o CS e os pacientes com PF, houve diferença somente em relação ao PFE ($p=0,0035$; $IC=1,964-59,1$).

Figura 13 – Imuno-histoquímica com anti-VEGF nos pacientes de PV, PSO, e CS.

Legenda: Pênfigo vulgar - (A) Positividade intensa dos queratinócitos, células inflamatórias e vasos da derme superficial, na área com acantólise suprabasal (estrela) – 30x, (B) Marcação discreta a intensa das glândulas sudoríparas – 30x. Psoríase - (C) Positividade intensa dos queratinócitos, células inflamatórias e endoteliais – 15x. (D) Marcação intensa da unidade pilossebácea e das células endoteliais – 20x. Controle saudável - (E) Positividade leve nos queratinócitos e (F) nos anexos – 20x.

Quadro 6 – Análise imuno-histoquímica da expressão do VEGF nos espécimes dos pacientes com PFE, PFNE e dos controles (PV, PSO, CS) – interpretação manual.

- A expressão do VEGF é maior no PFE em relação ao PFNE e aos CS, e semelhante ao PV e PSO.
- A positividade com anti-VEGF no PFNE foi semelhante aos CS e inferior aos grupos PV e PSO.

4.2.2.2 Análise da expressão da endogлина – interpretação manual

As amostras marcadas com anti-Eng apresentaram positividade exclusivamente nas células endoteliais. Não houve marcação dos queratinócitos, células inflamatórias e anexos. Entre os pacientes com PF, observamos positividade para Eng nos vasos de 13 amostras de pele obtidas no PFE, sendo 8 com marcação leve e 5 com marcação intensa. No PFNE houve positividade em 11 casos, sendo 4 com marcação leve e 7 com marcação intensa nos vasos (Figura 14; Tabela 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o PFE e o PFNE quanto à positividade com anti-Eng.

Figura 14 – Imuno-histoquímica com anti-Eng no PFE e PFNE.

Legenda: PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica (A) Clivagem intraepidérmica alta (estrela) e vasos negativos com anti-Eng (círculo) – 20x. (B) Positividade nas células endoteliais dos vasos da derme papilar e superficial – 20x. PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica (C) Área de acantólise sem marcação dos vasos (círculo) – 20x. (D) Positividade intensa dos vasos da derme superficial (seta) – 20x.

Tabela 4 – Estudo imuno-histoquímico com anti-Eng nas amostras de pele dos pacientes de PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS) – análise manual.

PFE		PFNE		PV		PSO		CS	
Paciente	Eng	Paciente	Eng	Paciente	Eng	Paciente	Eng	Paciente	Eng
PF-2	1	PF-1	0	PV-1	0	PSO-1	0	CS-1	0
PF-3	2	PF-2	2	PV-2	2	PSO-2	0	CS-2	0
PF-4	1	PF-3	2	PV-3	1	PSO-3	2	CS-3	0
PF-6	0	PF-7	2	PV-4	2	PSO-4	2	CS-4	0
PF-7	2	PF-8	2	PV-5	2	PSO-5	1	CS-5	0
PF-9	1	PF-12	1	PV-6	2	PSO-6	2	CS-6	0
PF-10	0	PF-13	2	PV-7	2	PSO-7	2	CS-7	0
PF-13	2	PF-14	1	PV-8	2	PSO-8	2	CS-8	0
PF-14	2	PF-17	0	PV-9	2	PSO-9	2	CS-9	0
PF-15	0	PF-18	0	PV-10	2	PSO-10	2	CS-10	0
PF-16	1	PF-19	0						
PF-17	0	PF-21	1						
PF-21	1	PF-23	2						
PF-22	2	PF-26	2						
PF-23	1	PF-27	1						
PF-26	1	PF-28	0						
PF-27	0	PF-31	0						
PF-29	1								
PF-31	0								
Totais	n=19		n=17		n=10		n=10		n=10

Legenda: CS – controle saudável; Eng – endoglina; PF – pênfigo foliáceo; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; PSO – psoríase; PV – pênfigo vulgar.

Nos grupos controles observou-se marcação com anti-Eng em 9 pacientes com PV (1 leve; 8 intensa). Entre os pacientes com PSO, houve positividade leve em 1 paciente e intensa em 7 pacientes. Todas as amostras de pele dos indivíduos saudáveis foram negativas para anti-Eng (Tabela 4; Figura 15). Ao compararmos a presença de anti-Eng nos pacientes com PF com os grupos controles, observamos diferença somente entre o PFE e CS ($p=0,0004$; $CI=3,70-\infty$) e o PFNE e CS ($p=0,001$; $CI=4,168-\infty$).

Figura 15 – Imuno-histoquímica com anti-Eng na pele de pacientes com PV, PSO e CS.

Legenda: Pênfigo vulgar - (A) Acantólise suprabasal (estrela) e positividade intensa (seta cheia) dos vasos da derme papilar e leve na derme superficial (seta pontilhada) – 20x. (B) Vaso positivo (seta cheia) e negativo (círculo) com anti-Eng, em uma área com acantólise suprabasal (estrela) – 40x. Psoríase – (C) Positividade ausente (círculo) e discreta (seta pontilhada) das células endoteliais na derme superficial – 20x. (D) Marcação intensa dos capilares da derme papilar (seta cheia) – 40x. Controles saudáveis – (E) Ausência de positividade dos vasos – 20x, (F) no maior detalhe – 40x.

Quadro 7 – Avaliação imuno-histoquímica da expressão da Eng nos espécimes dos pacientes com PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS) – análise manual.

- A positividade com anti-Eng foi semelhante no PFE e no PFNE e diferente do CS.

4.2.2.3 Avaliação automatizada do estudo imuno-histoquímico com anti-VEGF e anti-Eng

Todas as lâminas de vidro preparadas para a análise IH com anti-VEGF e anti-Eng foram digitalizadas utilizando o escâner digital de lâminas Aperio Scanscope. A imagem obtida foi subsequentemente avaliada com o programa de contagem de *pixels*, para mensurar a expressão tecidual de VEGF, e o programa de contagem de vasos, para calcular o número de vasos marcados com anti-Eng.

A análise automatizada da positividade com anti-VEGF foi realizada através da detecção da intensidade e da contagem de *pixels* positivos para a cor vermelha, utilizada como cromógeno para demonstrar a reação. As áreas positivas foram destacadas em laranja, as regiões com intensidade leve em amarelo e as áreas com marcação intensa em vermelho. Regiões negativas receberam a cor azul. O resultado da análise foi expresso em número absoluto de *pixels* positivos (amarelos, laranjas e vermelhos) e negativos (azuis), bem como o número total de *pixels* e o tamanho da área avaliada (Figura 16).

Figura 16 – Análise automatizada da positividade por IH.

Legenda: (A) A primeira etapa da análise consiste na seleção do fragmento a ser estudado (linha verde). (B) O programa de contagem de *pixels* calcula os pontos com marcação leve (amarelo) moderada (laranja) e intensa (vermelho), além das áreas negativas (azul). (C) O resultado do número de *pixels* positivos obtido foi dividido pela área total analisada.

Para uniformizar a comparação das lâminas, o número total de *pixels* positivos foi dividido pela área total de cada fragmento, uma vez que as amostras de pele apresentavam dimensões diferentes. Essa etapa da análise possibilitou comparar o número de *pixels* entre espécimes com tamanhos distintos e evitou que amostras menores resultassem em um número total menor de *pixels* e vice-versa (Tabela 5). Esta variável contínua foi comparada entre os grupos de pacientes do estudo e não se obteve diferença significativa.

Tabela 5 – Análise automatizada da expressão de VEGF nos fragmentos de pele de pacientes com PFE e PFNE e controles (PV, PSO e CS).

PFE	+/Área	PFNE	+/Área	PV	+/Área	PSO	+/Área	CS	+/Área
PF-2	0,0421	PF-1	0,0877	PV-1	0,0282	PSO-1	0,1876	CS-1	0,0013
PF-3	0,1255	PF-2	0,2064	PV-2	0,2439	PSO-2	0,2857	CS-2	0,0882
PF-4	0,0862	PF-3	0,2428	PV-3	0,0497	PSO-3	0,1038	CS-3	0,0033
PF-6	0,1919	PF-7	0,0429	PV-4	0,2145	PSO-4	0,0306	CS-4	0,0484
PF-7	0,0786	PF-8	0,5200	PV-5	0,0838	PSO-5	0,1345	CS-5	0,0195
PF-9	0,1259	PF-12	0,2269	PV-6	0,3593	PSO-6	0,0965	CS-6	0,0076
PF-10	0,3545	PF-13	0,1767	PV-7	0,2080	PSO-7	0,0796	CS-7	0,0055
PF-13	0,2990	PF-14	0,2053	PV-8	0,1642	PSO-8	0,1373	CS-8	0,0006
PF-14	0,1121	PF-17	0,2282	PV-9	0,0265	PSO-9	0,0998	CS-9	0,0031
PF-15	0,0958	PF-18	0,1104	PV-10	0,0179	PSO-10	0,0389	CS-10	0,0092
PF-16	0,0134	PF-19	0,0002						
PF-17	0,0611	PF-21	0,0306						
PF-21	0,1989	PF-23	0,2011						
PF-22	0,0154	PF-26	0,0529						
PF-23	0,0663	PF-27	0,3760						
PF-26	0,1304	PF-28	0,0000						
PF-27	0,1184	PF-31	0,0160						
PF-29	0,0886								
PF-31	0,5914								
Total	n=19		n=17		n=10		n=10		n=10
Média	0,1471		0,1664		0,1396		0,1194		0,0187
DP	0,1387		0,1542		0,1161		0,0745		0,0283

Legenda: CS – controles saudáveis; DP – desvio padrão; PF – pênfigo foliáceo; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; PSO – psoríase; PV – pênfigo vulgar. +/-Área – número de *pixels* positivos divididos pelo número total de *pixels* e área analisada.

Quadro 8 – Análise automatizada da expressão do VEGF nos espécimes dos pacientes com PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS).

- A avaliação automatizada da expressão do VEGF foi semelhante entre ambas as fases do PF e em comparação aos controles com PV e PSO.

Para a análise automatizada da IH com anti-Eng, o número total de vasos positivos foi dividido pela área total da amostra, para padronizar a avaliação entre espécimes de tamanhos diferentes (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise automatizada da expressão de Eng nos espécimes de pacientes de PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO e CS).

PFE	V/Área	PFNE	V/Área	PV	V/Área	PSO	V/Área	CS	V/Área
PF-2	0,50	PF-1	2,30	PV-1	0,38	PSO-1	0,03	CS-1	0,00
PF-3	4,88	PF-2	2,87	PV-2	8,22	PSO-2	0,19	CS-2	0,00
PF-4	0,45	PF-3	25,06	PV-3	0,10	PSO-3	0,59	CS-3	0,00
PF-6	0,00	PF-7	5,46	PV-4	27,28	PSO-4	0,36	CS-4	0,00
PF-7	1,85	PF-8	0,00	PV-5	2,26	PSO-5	3,41	CS-5	0,00
PF-9	0,47	PF-12	0,29	PV-6	20,65	PSO-6	4,77	CS-6	0,00
PF-10	0,00	PF-13	1,45	PV-7	17,88	PSO-7	3,26	CS-7	0,00
PF-13	3,68	PF-14	15,05	PV-8	61,72	PSO-8	1,40	CS-8	0,00
PF-14	6,03	PF-17	0,00	PV-9	17,06	PSO-9	2,69	CS-9	0,00
PF-15	0,00	PF-18	0,00	PV-10	22,76	PSO-10	7,75	CS-10	0,00
PF-16	0,08	PF-19	0,00						
PF-17	0,00	PF-21	0,83						
PF-21	1,67	PF-23	1,90						
PF-22	3,61	PF-26	23,21						
PF-23	1,10	PF-27	0,00						
PF-26	0,66	PF-28	0,00						
PF-27	0,00	PF-31	0,00						
PF-29	0,01								
PF-31	0,00								
Total	n=19		n=17		n=10		n=10		n=10
Média/DP	1,31/1,86		4,61/8,21		17,83/18,26		2,44/2,47		0/0

Legenda: CS – controles saudáveis; DP – desvio padrão; PF – pênfigo foliáceo; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PFNE – pênfigo foliáceo na fase não-eritrodérmica; PSO – psoríase; PV – pênfigo vulgar. V/Área – número de vasos positivos dividido pela área total analisada.

Não houve diferença entre o número de vasos positivos com anti-Eng entre as duas fases do PF. Tanto no PFE quanto no PFNE, a expressão de Eng foi menor do que no PV ($p < 0,05$), semelhante à PSO ($p > 0,05$) e maior do que os CS ($p < 0,05$).

Quadro 9 – Análise automatizada da reação imuno-histoquímica com anti-Eng nas amostras de pele dos pacientes com PFE e PFNE e dos controles (PV, PSO, CS).

- O PFE e o PFNE apresentaram número de vasos positivos com anti-Eng semelhantes entre si e com os pacientes com PSO. A positividade em ambas as fases do PF foi menor do que nos pacientes com PV.

4.2.2.4 Estudo imuno-histoquímico dos depósitos de anticorpos IgG, IgM, IgA e C3 na pele de pacientes com PF eritrodérmico

Amostras de pele ($n=6$) obtidas de 5 pacientes com PFE foram analisadas com os anticorpos anti-IgG, -IgM, -IgA e -C3 (Tabela 7). Na epiderme, houve positividade intercelular (padrão em colmeia de abelhas) ao anti-IgG (leve em 3; intensa em 3) (Figura 17), e ao anti-C3 (leve em 2; intensa em 4) (Figura 18). Com anti-IgA houve positividade entre os queratinócitos em 5 pacientes, sendo em 2 leve e em 3 intensa. Apenas 1 paciente apresentou positividade leve com anti-IgM.

Tabela 7 – Avaliação IH de IgG, IgM, IgA e C3 na epiderme e zona da membrana basal de amostras de pele de pacientes com PFE.

PACIENTE	IgG		IgM		IgA		C3	
	E	ZMB	E	ZMB	E	ZMB	E	ZMB
PF-4	2	0	1	1	1	0	1	1
PF-10	1	0	0	0	2	0	2	2
PF-15	2	2	0	0	2	2	2	2
PF-22 a*	2	0	0	0	0	0	2	0
PF-22 b*	1	0	0	0	2	0	1	2
PF-31	1	0	0	0	1	1	2	0

Legenda: E – epiderme; PF – pênfigo foliáceo; ZMB – zona da membrana basal.

* As amostras PF-22a e PF-22b foram obtidas do paciente PF-22.

Figura 17 – Anti-IgG: imunofluorescência direta vs. imuno-histoquímica.

Legenda: (A) Depósitos intercelulares intraepidérmicos de IgG à imunofluorescência direta – 40x. Análise imuno-histoquímica com anti-IgG exibindo positividade (B) entre os queratinócitos da epiderme, na zona da membrana basal, nas células inflamatórias, vasos e (C) anexos – 40x.

A ZMB também apresentou positividade linear com anti-C3 em 4 pacientes (1 leve; 3 intensa), com anti-IgA em 2 pacientes (1 leve; 1 intensa), com anti-IgG em 1 paciente (intensa) e com anti-IgM em 1 paciente (leve).

Figura 18 – Anti-C3: imunofluorescência direta vs. imuno-histoquímica.

Legenda: (A) Imunofluorescência direta com depósitos de C3 entre os queratinócitos epidérmicos (40x). (B) Análise imuno-histoquímica com depósitos de anti-C3 intercelulares intraepidérmicos, nas células inflamatórias, vasos (40x) e (C) anexos (20x).

Células inflamatórias, vasos e anexos dérmicos também mostraram positividade aos anticorpos utilizados (Tabela 8). As células inflamatórias foram marcadas com anti-IgG (2 leve; 4 intensa) e com anti-C3 (1 leve; 5 intensa) em todas as amostras. Somente 1 paciente apresentou positividade leve com anti-IgM e intensa com anti-IgA. Os vasos foram positivos em todas as amostras com anti-IgG (2 leve; 4 intensa), anti-C3 (1 leve; 5 intensa) e anti-IgA (3 leve; 3 intensa). Com anti-IgM houve marcação dos vasos de 5 pacientes (3 leve; 2 intensa).

Os anexos foram marcados com anti-IgG de forma leve e com anti-C3 (3 leve; 3 intensa) em todos os pacientes. Foi observada positividade leve ao anti-IgA em 3 pacientes e positividade leve ao anti-IgM em 1 paciente.

Tabela 8 – Avaliação imuno-histoquímica das células inflamatórias, vasos e anexos utilizando anti-IgG, -IgM, -IgA e -C3.

PACIENTE	IgG			IgM			IgA			C3		
	I	V	A	I	V	A	I	V	A	I	V	A
PF-4	2	1	1	1	2	1	0	2	0	2	2	1
PF-10	2	2	1	0	2	0	0	1	1	2	2	1
PF-15	2	2	1	0	1	0	2	2	1	2	2	2
PF-22 a*	1	2	1	0	1	0	0	1	1	2	2	2
PF-22 b*	2	2	1	0	1	0	0	2	0	2	2	2
PF-31	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1

Legenda; A – anexos; I – células inflamatórias; V – vasos; PF – pênfigo foliáceo..

* As amostras PF-22a e PF-22b foram obtidas do paciente PF-22.

Quadro 10 – Avaliação imuno-histoquímica dos depósitos de imunocomplexos (IgG, IgM, IgA e C3) na pele dos pacientes com PF eritrodérmicos.

- Depósitos intercelulares intraepidérmicos de IgG, IgA e C3 foram observados em todos os fragmentos.
- A positividade da zona da membrana basal ocorreu principalmente com C3.
- As células inflamatórias e os anexos foram marcados por IgG e C3.
- Houve positividade dos vasos com todos os anticorpos (IgG, IgM, IgA e C3).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O PF é uma dermatose autoimune com produção de autoanticorpos da classe IgG contra a Dsg1. A ligação antígeno-anticorpo promove o desarranjo dos desmossomas, com perda da adesão intercelular entre os queratinócitos e a formação de uma clivagem intraepidérmica alta⁶.

Além da Dsg1, outros alvos antigênicos não pertencentes à superfamília das caderinas são reconhecidos pelos autoanticorpos do paciente com PF, participando do dano aos queratinócitos e induzindo a acantólise²². De acordo com o perfil de autoanticorpos produzidos pelo paciente com PF, diferentes vias de sinalização intracelular podem ser ativadas, levando à apoptose celular, quimiotaxia de células inflamatórias e ativação das células endoteliais⁶⁵. Isso contribui para que a manifestação clínica do PF seja espectral, podendo ser observadas desde formas frustras da doença, com discreto eritema e descamação localizados na face ou couro cabeludo, até apresentações extensas evoluindo para eritrodermia^{2,6}.

A eritrodermia adquirida em adultos é uma manifestação clínica exuberante compartilhada por dermatoses autoimunes, doenças inflamatórias, tumorais e por hipersensibilidade a drogas^{38,106,107}. A maioria das publicações em língua inglesa na literatura médica a respeito dessa apresentação do PF corresponde a relatos de casos¹⁰⁸⁻¹¹⁶. Há também séries de casos de eritrodermia com descrição das etiologias mais comumente a ela associadas^{30,37,38}.

A eritrodermia foi descrita em 2 a 6,25% dos pacientes com PF. Por outro lado, nos pacientes eritrodérmicos o PF é a causa da eritrodermia em 0,76% a 6,25% dos casos^{30,37,38}, sendo menos frequente do que a associação com PSO e eczema^{38,106,107}. No presente estudo, a eritrodermia ocorreu em 17,2% (31/180) dos pacientes com PF atendidos no Ambulatório de DBA do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP. A maior proporção de casos de PF eritrodérmico observada em nossa casuística pode ser atribuída ao fato de que o complexo HCFMUSP seja um hospital estadual com nível de atenção terciário dentro do Sistema Único de Saúde brasileiro, e referência no atendimento a pacientes com DBA em todo o Brasil e na América Latina.

A revisão da literatura revela apenas 11 relatos de casos a respeito de pacientes com PF que desenvolveram eritrodermia na fase inicial da doença (10 indivíduos)^{28,108-113,115-117} ou durante sua evolução (1 indivíduo)¹¹⁴. Dentre esses,

somente 1 paciente apresentava PF endêmico (fogo selvagem)¹⁰⁸. A idade desses pacientes variou entre 1 e 79 anos (média=48,4 anos), sendo 60% dos casos em adultos, com predomínio do sexo masculino (2,67:1). Em 8 casos, a progressão para a eritrodermia ocorreu entre 1 semana a 7 meses^{108-112,114,115,117}; em 3 casos essa informação não foi divulgada^{28,113,116}.

A faixa etária entre 5 e 72 anos dos pacientes com PFE foi semelhante a dos casos publicados, assim como a média de idade (42,7 anos). Em contrapartida, encontramos um número superior de adultos com PFE (90,3%) e de pacientes do sexo feminino (2,87:1). O maior número de casos de PFE nas mulheres reflete o predomínio do PF no sexo feminino, que varia de 1,5:1 a 4,1:1 no mundo¹¹⁸ e corresponde a 1,68:1 (62,7%) dos pacientes com PF no Ambulatório de DBA do HCFMUSP.

Em todos os pacientes relatados na literatura, o diagnóstico foi confirmado através do exame histopatológico e da IFD. A análise histopatológica desses casos mostrou a presença de clivagem subcórnea/granulosa (10 casos)¹⁰⁸⁻¹¹⁷ ou de espongiose eosinofílica (1 caso)²⁸. Na IFD, houve depósitos intercelulares intraepidérmicos de IgG (11 casos), C3 (7 casos) e IgA (1 caso), além de fluorescência na zona da membrana basal (C3 – 2 casos; IgG – 1 caso) e na parede dos vasos (C3 – 2 casos; IgM – 1 caso). Nos pacientes eritrodérmicos com PF incluídos nesse estudo, o exame anátomo-patológico também evidenciou a presença de clivagem acantolítica alta em 92,8%. A IFD, além de demonstrar os depósitos de IgG e de C3 intercelulares intraepidérmicos, também foi positiva na zona da membrana basal em 8 casos (Tabela 9).

A média de idade (42,7 anos) e o tempo de hospitalização (41,2 dias) dos pacientes com PFE deste estudo foram semelhantes às séries de casos já publicadas incluindo pacientes com eritrodermia em geral (41,6 a 53,78 anos; 13,85 a 30 dias)^{30,37}. No entanto, a proporção de pacientes do sexo feminino foi maior em nossa casuística (2,87:1), contrastando com os demais estudos, onde o sexo masculino predominou (1,85:1 a 3:1)^{30,37,38,106,107}.

Tabela 9 – Comparação entre as características clínicas, laboratoriais e evolução dos pacientes com PFE publicados na literatura vs. dados do presente estudo.

	PFE (literatura)	PFE (presente estudo)
Ano	1985-2012	1991-2015
Idade (média)	1-79 anos (48,4)	5-72 anos (42,7)
Gênero	8M/3F 2,67M:1F	8M/23F 2,87F:1M
Eritrodermia ao diagnóstico	10	25
Histopatológico	10 clivagem alta 1 espongiose eosinofílica	26 clivagem alta 2 pústula espongiforme
IFD	IgG (11); C3 (7); IgA (1)	IgG (28); C3 (24)
Tratamento	Prednisona (4) Prednisona + IMS (3) Prednisona + IMD (1) Rituximabe (2)	Prednisona (23) Prednisona + IMS (5) Prednisona + IMD (3)
Óbitos	3	0

Legenda: F – feminino; IFD – imunofluorescência direta; IMS – imunossupressor; IMD – imunomodulador; M – masculino; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica.

Os doentes com PFE tiveram internação hospitalar mais duradoura do que a média dos indivíduos internados na Divisão de Dermatologia do HCFMUSP de setembro de 2002 a setembro de 2010 (41,9 vs. 13,0 dias), além de maior frequência de infecção cutânea (96,7 vs. 20,6%). Apesar das complicações infecciosas, com o cuidado intensivo e especializado dedicado aos pacientes na Enfermaria da Divisão de Clínica Dermatológica do HCFMUSP, não foi registrado nenhum óbito.

O vírus do herpes simples (HSV) é o principal causador de infecção viral entre os indivíduos com DBA e está relacionado com o surgimento, piora das lesões ou refratariedade ao tratamento imunossupressor^{96,119,120}. Por esse motivo, observou-se internação mais prolongada dos doentes com PFE infectados por HSV.

Staphylococcus aureus foi a bactéria mais identificada na hemocultura dos pacientes com PFE, à semelhança dos demais estudos¹²¹. Por um lado, a infecção

por *Staphylococcus aureus* é comum nas doenças crônicas que afetam a integridade da barreira cutânea, como o eczema, a PSO e o PF¹²². Por outro, a própria bactéria é capaz de aumentar o dano à epiderme, contribuindo para o agravamento dessas doenças¹²³.

É importante ressaltar que o *Staphylococcus aureus* produz as toxinas esfoliativas A e B capazes de provocar o impetigo bolhoso, quando sua síntese e sua ação são localizadas, ou a síndrome da pele escaldada, nos casos em que as toxinas atingem a corrente sanguínea e não são adequadamente eliminadas pelos rins¹²⁴. A ação proteolítica de ambas causa a clivagem da Dsg1¹²⁵ e desencadeia eritema, bolhas flácidas e descamação difusas. Nesta situação, o quadro clínico é indistinguível do PF e também apresenta características histopatológicas semelhantes, com a formação de uma clivagem intraepidérmica alta¹²⁴. A diferenciação entre o PF e a síndrome da pele escaldada só é possível através da IFD, IFI ou ELISA¹²⁶.

As toxinas do *S. aureus* também atuam como superantígenos e promovem o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos B ativados e pelos queratinócitos¹²⁷. Pacientes eritodérmicos apresentam maior colonização ou infecção por *Staphylococcus aureus* e sua presença na pele de pacientes com eczema e com PSO correlaciona-se com maior gravidade da doença ou sua exacerbação¹²². A colonização dos pacientes com PF por *S. aureus* e a produção de toxinas bacterianas tanto na fase ativa da doença quanto em sua remissão ainda não foram estudadas. Seu conhecimento poderá esclarecer o papel do *S. aureus* na evolução do PF.

Estudos prévios avaliaram a relação entre a gravidade do PF e o nível sérico dos autoanticorpos com resultados conflitantes¹²⁵. Em nossa análise, os pacientes com PF apresentaram títulos de IFI e níveis séricos de anticorpos anti-Dsg1 significativamente aumentados durante o PFE em comparação com o PFNE ($p < 0,05$).

Embora os resultados estejam de acordo com os estudos que demonstraram níveis séricos elevados de IgG durante o PF ativo, já foram descritos pacientes em remissão clínica com níveis séricos aumentados de autoanticorpos. Tal fato pode ser atribuído à variação dos subtipos de IgG produzidos conforme a progressão do PF. IgG4 é observada principalmente durante a fase ativa do PF enquanto IgG1 predomina durante a remissão da doença¹²⁸. Além da maior da síntese de IgG1 anti-

Dsg1, a presença de outros autoanticorpos IgG não-patogênicos pode justificar a manutenção de níveis elevados de IgG durante a remissão do PF²². Por esse motivo, esse parâmetro não pode ser utilizado exclusivamente para definir o prognóstico da doença e o tratamento dos pacientes com PF.

Além dos autoanticorpos do PF, a ação combinada de quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas pode aumentar o dano tecidual e favorecer o desenvolvimento da eritrodermia. Haja vista, a eritrodermia é uma apresentação clínica compartilhada por doenças com diferentes etiologias como o linfoma, a PSO e as reações adversas a drogas. Em 1996, Creamer et al. demonstraram que pacientes eritrodérmicos com PSO e com eczema apresentam em comum a elevação do VEGF sérico e tecidual, sugerindo sua participação no desenvolvimento da eritrodermia⁶⁶.

Para avaliar um fator preditivo mais preciso de gravidade no PF, nesse estudo analisamos a expressão de VEGF, sVEGFR-1 e Eng nos pacientes com PF que desenvolveram ao menos um episódio de eritrodermia durante a evolução da doença. Amostras obtidas de pacientes com PV e PSO também foram incluídas no estudo como controles positivos, uma vez que o VEGF se encontra aumentado nos pacientes com essas enfermidades^{66,87}.

Níveis séricos elevados de VEGF foram encontrados no PFE em comparação com PFNE ($p < 0,05$) e com CS ($p < 0,001$). Seria esperado encontrar tal aumento nos pacientes com PF, especialmente eritrodérmicos, uma vez que a perda da integridade da pele é acompanhada pela ativação de uma série de processos de reparação tecidual mediados por citocinas angiogênicas como o VEGF e a Eng¹²⁹.

Em condições fisiológicas, o VEGF é produzido preferencialmente pelas células endoteliais¹⁰⁵ e pelos queratinócitos das camadas superiores da epiderme, onde participa da diferenciação celular¹⁰⁴. Pudemos confirmar este fato ao verificarmos que na pele dos indivíduos saudáveis do grupo controle houve expressão discreta do VEGF na epiderme e nos vasos.

Porém, uma vez que ocorre a quebra da barreira cutânea, inicia-se o processo de reparação tecidual que envolve a quimiotaxia de células inflamatórias e a liberação de fatores de crescimento para estimular a proliferação celular e possibilitar a reepitelização. Diversas citocinas podem interferir na síntese e na ação do VEGF e alterar sua ligação a receptores celulares e receptores circulantes solúveis (sVEGFR).

O sVEGFR-1 é capaz de se ligar ao VEGF circulante e de reduzir sua biodisponibilidade. Por se tratar do principal mecanismo regulador do VEGF circulante¹³⁰, também dosamos os níveis séricos de sVEGFR-1, a fim de avaliar sua correlação com o VEGF no PF. Os níveis de sVEGFR-1 obtidos tanto no PFE quanto no PFNE foram semelhantes e não se correlacionaram com os níveis de VEGF em nenhuma das fases do PF. Entretanto, houve correlação fraca entre os níveis séricos de sVEGFR-1 e de anti-Dsg1 no PFNE ($r=0,4249$; $p=0,0342$). Esse resultado sugere que o sVEGFR-1 se eleva para compensar o aumento do VEGF, como previamente observado em pacientes com melanoma maligno⁸⁶.

Com esses resultados, pudemos demonstrar que o dano cutâneo mediado pelos autoanticorpos do PF é acompanhado pelo aumento da expressão de VEGF, com elevação do seu nível sérico principalmente durante a eritrodermia. Portanto, seria esperado que nos pacientes com PF também ocorresse o aumento da expressão tecidual do VEGF. A fim de verificar essa hipótese e de complementar a análise dos marcadores angiogênicos no PF, realizamos a avaliação IH do VEGF e da Eng na pele de pacientes com PF na vigência ou não de eritrodermia.

Durante o PFNE, a expressão do VEGF na epiderme foi semelhante à da pele normal, porém houve diferença em relação à positividade encontrada nas células inflamatórias e nos vasos. Isso sugere que nas formas mais localizadas do PF, a agressão imunomediada à epiderme suscita uma resposta inicialmente dependente das células inflamatórias e das células endoteliais, como se observa na etapa inflamatória inicial da cicatrização¹³¹.

Já o PFE caracteriza-se por intenso dano tecidual decorrente da produção aumentada de autoanticorpos, conforme demonstramos através dos maiores títulos de IFI e de níveis séricos de anti-Dsg1 em relação ao PFNE. Nesse momento da doença, a presença aumentada de VEGF em comparação com os CS e com o PFNE reforçou a hipótese de que os queratinócitos são uma fonte de VEGF, à semelhança do que ocorre na PSO⁶⁸. De fato, quando comparamos o escore de VEGF na fase eritrodérmica do PF com os indivíduos com PSO e com PV, os grupos foram semelhantes ($p=0,06674$; $IC=0,04-4,58$). Já a fase não-eritrodérmica do PF mostrou-se diferente tanto da PSO ($p=0,049$; $CI\ 0,01-1,12$) quanto do PV ($p=0,049$; $CI\ 0,01-1,12$).

Embora o valor do p calculado tenha mostrado uma diferença entre os grupos analisados, o tamanho da amostra contribuiu para que o intervalo de confiança

obtido fosse amplo. Esta limitação do estudo se deve ao fato de termos avaliado uma manifestação incomum de uma doença rara, apesar de a casuística de pacientes aqui apresentada ser a maior até o momento em relação ao número de casos de eritrodermia no PF. Os resultados obtidos são relevantes para o melhor entendimento da patogênese da doença e do seu processo de reparação, e poderão ser aplicados também para outras DBA.

O VEGF atua de forma autócrina, estimulando a proliferação dos queratinócitos⁶⁸, e de maneira parácrina, induzindo vasodilatação e multiplicação das células endoteliais⁷⁰. A deficiência do VEGF provoca o retardo da cicatrização em função da menor multiplicação dos queratinócitos e reepitelização mais lenta, e da angiogênese inadequada, com redução do aporte de nutrientes e oxigênio¹³². A positividade tecidual do VEGF no PFNE foi semelhante a dos indivíduos saudáveis, o que sugere uma expressão tecidual inapropriada do VEGF nesse período.

Os efeitos da redução do VEGF na cicatrização cutânea puderam ser avaliados com o advento de terapias sistêmicas anti-VEGF para o tratamento de doenças caracterizadas por aumento da proliferação vascular, como o câncer colorretal e de mama, e a degeneração macular relacionada à idade¹³³. O retardo na cicatrização foi uma das potenciais complicações observadas em indivíduos que receberam anti-VEGF sistêmico. Christoforidis *et al.* demonstraram uma redução na formação de novos vasos na pele periocular de coelhos 2 semanas após tratamento intravítreo com anti-VEGF¹³⁴. As medicações anti-VEGF alteram a angiogênese, processo fundamental na etapa proliferativa da cicatrização, aumentam o risco de deiscência, de hérnia incisional e de infecção em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos. Por esse motivo, recomenda-se a suspensão das drogas anti-VEGF pelo menos 6 semanas antes de um procedimento cirúrgico eletivo e seu reinício após 4 semanas¹³³.

Em contrapartida, a produção excessiva de VEGF pode aumentar a vasodilatação e a permeabilidade vascular a células inflamatórias, agravando o dano tecidual. Já foi demonstrado que esse mecanismo contribui para o prolongamento das lesões de PSO⁶⁸. Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que a agressão à epiderme induzida pelos autoanticorpos do PF suscita a ativação das células inflamatórias e endoteliais, que passam a expressar VEGF com o intuito de possibilitar a reepitelização. No entanto, níveis altos de IgG anti-Dsg1 aumentam a

quebra da barreira cutânea e estimulam uma produção maior do VEGF pelos queratinócitos, como observado na fase eritrodérmica da doença.

A Eng também regula a ação do VEGF, atuando como um marcador da proliferação vascular. Na pele normal, a Eng foi encontrada nos queratinócitos basais do epitélio interfolicular e nas células endoteliais¹³⁵. A presença de Eng nas células endoteliais demonstra a ocorrência de neovascularização, etapa crucial do processo de cicatrização. A formação de novos vasos possibilita o aporte adequado de nutrientes, oxigênio e óxido nítrico necessários para a reparação da pele¹³². Por esse motivo, esperaríamos encontrar uma positividade maior de Eng concomitante a uma maior expressão do VEGF no PFE em comparação com o PFNE. Todavia, a expressão de Eng na pele dos pacientes com PFE foi semelhante a do PFNE, o que sugere uma angiogênese inadequada nesses indivíduos mesmo na presença aumentada do VEGF, contribuindo para o desenvolvimento da eritrodermia.

A redução da Eng promove a ativação constitutiva da via de sinalização dependente do TGF- β 1 na epiderme, que por sua vez diminui a proliferação dos queratinócitos. Já nas células endoteliais, a redução da Eng acarreta a diminuição da síntese de óxido nítrico e a sinalização mediada pelo TGF- β 1, comprometendo a angiogênese¹³⁶.

Assim, poderíamos propor que o dano tecidual causado pelos autoanticorpos do PF seria mais lentamente revertido nos pacientes eritrodérmicos que apresentam menor expressão de Eng, contribuindo para a persistência e a disseminação das lesões. Desse modo, manifestações graves do PF estariam relacionadas não apenas à síntese aumentada de autoanticorpos promovendo a perda da adesão entre os queratinócitos e a clivagem intraepidérmica, como também a uma cicatrização inadequada, determinando a cronificação das lesões.

Além da resposta vascular decorrente da ação direta da IgG anti-Dsg1 na epiderme, as células inflamatórias também atuam como fonte de VEGF na pele, tendo participação ativa na fase inicial da cicatrização. O influxo de neutrófilos na pele lesada promove a liberação de fatores de crescimento e de citocinas, que estimulam a proliferação celular e a quimiotaxia de outras células inflamatórias¹³¹. O papel das células inflamatórias e das células endoteliais na patogênese do PF ainda não foi totalmente esclarecido.

Pacientes com FS apresentam predomínio de linfócitos T CD4+ produtores de citocinas com padrão Th₂¹³⁷. No PV, os linfócitos T CD4+ estimulam os linfócitos B a

produzirem IgG4 na fase ativa da doença¹³⁸. O aumento do nível de IL-4 e de IL-10 também se correlaciona com a gravidade da doença e a recorrência das lesões nos pacientes com PV¹³⁹. Esses achados sugerem que as células inflamatórias participam da imunomodulação no pênfigo e contribuem para a progressão da doença. Estudos adicionais a respeito do perfil das células inflamatórias presentes nas lesões de PF e do padrão de citocinas por elas produzidas poderão esclarecer sua participação na patogênese do PF.

Frente a essas novas descobertas, a teoria da compensação passou a oferecer elementos plausíveis para entender a localização da clivagem no PF, porém não suficientes para explicar o motivo pelo qual pacientes com quadro clínico compatível com pênfigo e com depósitos de IgG intercelulares intraepidérmicos por estudo de imunofluorescência direta não apresentam IgG anti-Dsg circulante.

A dissociação clínico-patológica motivou o surgimento de uma teoria para explicar o desenvolvimento das lesões de pênfigo, denominada hipótese das agressões múltiplas (*multiple-hit hypothesis*). Segundo essa teoria, a acantólise é um processo dependente de múltiplos autoanticorpos capazes de reconhecer a Dsg e outros antígenos não-caderina, entre eles os receptores de acetilcolina²². A presença de níveis elevados de anticorpo anti-receptor muscarínico nos pacientes com PF e com PV na fase ativa da doença e a queda de seus níveis quando em remissão favorece essa hipótese¹⁴⁰.

Diferentes subtipos de receptores de acetilcolina são expressos nos queratinócitos conforme sua maturação e distribuição na epiderme¹⁴¹. Os receptores nicotínicos constituem canais iônicos capazes de alterar a permeabilidade ao Ca^{2+} e, conseqüentemente, o potencial da membrana celular e a conformação dos desmossomas. Já os receptores muscarínicos são acoplados à proteína G, através da qual ativam quinases e fosfatases intracelulares que regulam as moléculas de adesão intercelular¹⁴¹.

O receptor $\alpha 9$ de acetilcolina apresenta distribuição preferencial nas células da camada basal da epiderme, onde regula a fosforilação e defosforilação das vias intracelulares responsáveis pela adesão celular e pelas etapas iniciais da migração dos queratinócitos. Trata-se de um receptor de acetilcolínica que possui uma ação nicotínica mediada por canais iônicos que possibilitam o influxo de Ca^{2+} , ativando vias de sinalização dependentes de quinases de forma sequencial¹⁴². O estímulo inicial das quinases ligadas a Src e ao receptor de fator de crescimento epidérmico

(EGFR) promove a ativação das quinases Rho e Rac e, posteriormente, da proteína quinase C que por sua vez regula a fosforilação do citoesqueleto e dos desmossomas, contribuindo para seu desarranjo¹⁴².

A demonstração da presença de anticorpos na pele através da técnica de IFD permite a visualização de depósitos localizados na epiderme com alta sensibilidade e especificidade^{40,42,143}. No entanto, as estruturas dérmicas e seu arranjo arquitetural não podem ser precisamente avaliados pela IF e invariavelmente sua marcação é negativa por essa técnica. Assim, embora a IF seja um método consagrado para o diagnóstico das DBA, a avaliação de novos autoanticorpos patogênicos e o estudo da contribuição de antígenos situados na derme para o desenvolvimento da doença constituem importantes limitações desse método.

A IH possibilita a localização mais precisa dos imunocomplexos depositados no tecido em comparação à IFD. Há poucos estudos a respeito da utilização da IH como método diagnóstico nas DBA. Em 2012, Zhang et al. realizaram a análise IH com anti-IgG4 nas amostras de pele de pacientes com PF e PV. Os autores observaram positividade em 75% dos casos de PF e 66,7% dos pacientes com PV, porém não foi realizada uma comparação com os resultados de IFD⁵⁹. Villani et al. publicaram em 2016 um estudo no qual a IH com anti-C4d também foi capaz de demonstrar depósitos de complemento entre os queratinócitos epidérmicos⁵⁸. No entanto, uma análise IH mais ampla com as mesmas classes de anticorpos primários habitualmente empregados na IFD ainda não foi realizada no PF. Este é o primeiro estudo que compara a IH automatizada com a IFD no PF, utilizando um painel de anticorpos para a detecção dos imunocomplexos.

A análise IH com anti-IgG, -C3, -IgM e -IgA em 6 amostras de pele coletadas durante a fase eritrodérmica do PF demonstrou a deposição intercelular intraepidérmica desses anticorpos. A epiderme apresentou positividade ao IgG e C3 semelhante à observada na IFD. Houve marcação entre os queratinócitos com anti-IgM em 1 paciente e com anti-IgA em 5 pacientes, diferentemente do resultado obtido com a IFD (Tabela 10).

Tabela 10 – IFD vs. IH – comparação entre a detecção dos depósitos de IgG, C3, IgM e IgA na epiderme de pacientes de PFE.

PACIENTE	IgG				C3				IgM				IgA			
	E		ZMB		E		ZMB		E		ZMB		E		ZMB	
	IFD	IH	IFD	IH	IFD	IH	IFD	IH	IFD	IH	IFD	IH	IFD	IH	IFD	IH
PF-4	2	2	0	0	1	1	1	1	0	1*	2	1	0	1*	0	0
PF-10	2	1	0	0	2	2	1	2	0	0	1	0	0	2*	0	0
PF-15	2	2	0	2*	2	2	0	2*	0	0	0	0	0	2*	0	2*
PF-22 a	2	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0*	0	0
PF-22 b	2	1	0	0	1	1	0	2*	0	0	0	0	0	2*	0	0
PF-31	2	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	1*

Legenda: E – epiderme; IFD – imunofluorescência direta; IH – imuno-histoquímica; ZMB – zona da membrana basal; PF – pênfigo foliáceo.

* Achados positivos à imuno-histoquímica e não observados por imunofluorescência direta.

Obs.: As amostras PF-22 a e PF-22 b foram obtidas do paciente PF-22.

A presença de IgM na epiderme de 1 paciente pode estar relacionada à produção desta imunoglobulina contra a Dsg1 na forma endêmica do PF. A síntese de IgM é observada nos indivíduos que habitam as zonas endêmicas e constitui um indicador de progressão da fase pré-clínica da doença para a fase clínica¹⁰. Em análise retrospectiva dos estudos de IFD dos pacientes em acompanhamento no Ambulatório de DBA do HCFMUSP entre 2002 e 2012, depósitos de IgM foram encontrados entre os queratinócitos nos pacientes com PV (8,14%) e na zona da membrana basal dos pacientes com PF (11,9%)⁴⁰.

A menor quantidade de IgM depositada na epiderme em relação à IgG pode explicar o motivo pelo qual a IFD foi negativa para esse anticorpo. A técnica de IH inclui etapas de recuperação antigênica e amplificação do sinal que aumentam a sensibilidade do método¹⁴⁴. Além disso, a reação IH é revelada por um cromógeno durável, ao contrário dos fluorocromos utilizados na IFD que apresentam degradação espontânea e com a exposição à luz¹⁴⁵.

Outra diferença da IH em relação à IFD foi a presença de anti-IgA na epiderme de 5 amostras analisadas. A presença isolada de depósitos de IgA na epiderme é um critério diagnóstico para outra forma de pênfigo – o pênfigo por IgA, que se apresenta clinicamente com pústulas confluentes ou bolhas de conteúdo purulento e placas circinadas com descamação periférica distribuídas principalmente nas áreas intertriginosas¹⁴⁶. Os achados histopatológicos dessa doença também

diferem do PF, com maior presença de neutrófilos intraepidérmicos e perivascularres¹⁴⁷. No entanto, o pênfigo por IgA caracteriza-se pelo reconhecimento da desmocolina 1 e de outro antígeno não desmossômico ainda em identificação¹⁴⁸. Como os pacientes com PF foram incluídos no estudo após confirmação diagnóstica por IFD e IFI, e com IgG anti-Dsg1 circulante pela técnica de ELISA, podemos afirmar que se tratam de casos típicos de PF.

Estudos prévios avaliaram a presença de autoanticorpos da classe IgA em pacientes com pênfigo. No PV, a detecção de IgA anti-Dsg1 por imunoblotting ocorreu em 72% dos indivíduos na fase crônica da doença. Pela técnica de *ELISA*, em 2001, Futei et al. utilizaram um anticorpo monoclonal anti-IgA humana e encontraram IgA anti-Dsg3 em 2/30 pacientes com PV e em nenhum dos 19 pacientes com PF¹⁴⁹. Posteriormente, Mentink et al. realizaram estudo com um anticorpo policlonal anti-IgA humana em pacientes com PV e com PF e obtiveram 23,9% (22/92) de positividade anti-Dsg1 e 40,2% (37/92) de anti-Dsg3. Os mesmos autores também utilizaram esôfago de macaco como substrato para a detecção de IgA circulante por IFI em 53 amostras de soro e compararam os resultados obtidos com a positividade por *ELISA*. A IFI demonstrou depósitos intercelulares de IgA em 17 delas, enquanto que 32 foram positivas com a técnica de *ELISA*¹⁵⁰.

Assim como a técnica de *ELISA* foi mais sensível do que a IFI para demonstrar a presença de IgA anti-Dsg circulante, em nossa avaliação a IH se mostrou um método mais eficaz para avaliar a deposição tecidual de IgA do que a IFD. É possível que a presença de IgA tecidual demonstrada por IH represente um fenômeno de *epitope spreading*, uma vez que pacientes com pênfigo também produzem esta classe de imunoglobulina contra as Dsg¹⁴⁹⁻¹⁵¹. A degradação mais rápida dos imunocomplexos por IgA dificulta sua detecção por IFD em comparação à IFI, *ELISA* e IH¹⁵². Com a ampliação do número de casos estudados por IH e avaliação concomitante da presença de IgA circulante será possível verificar o papel dessa imunoglobulina na evolução do PF.

Ao contrário da IFD, a IH foi capaz de demonstrar a presença de depósitos de imunoglobulinas e de C3 nas estruturas dérmicas. Este achado é compatível com a descrição da síntese de autoanticorpos policlonais do PF capazes de reconhecer mais de 50 antígenos expressos tanto nas moléculas de adesão intercelular quanto em outras estruturas como as unidades pilosebácea e neurovascular e os receptores celulares de acetilcolina²².

A expressão das Dsg no folículo piloso varia conforme o grau de diferenciação celular e sua localização. A Dsg1 predomina na camada interna da bainha externa do folículo piloso, na bainha interna do folículo piloso e na região suprabasal¹⁵³. Em 2012, Ramos et al. observaram que as lesões no couro cabeludo estão associadas a um maior risco de complicações em pacientes com PF endêmico¹⁵⁴. Ohata et al. descreveram em 2014 depósitos de IgG e de C3 nos anexos em 5/17 (18,5%) pacientes com PF, por IFD. Maragno et al. confirmaram a presença de depósitos IgG1 e IgG4 nos folículos pilosos de pacientes com PF, que apresentavam na sua maioria a forma generalizada da doença (18/20; 90%)¹⁵⁵. A positividade IH dos anexos com anti-IgG e anti-C3 reforça esses achados e confirma a associação entre lesões no couro cabeludo e apresentações graves do PF.

O reconhecimento das estruturas dérmicas pela técnica de IFD é limitado, não sendo possível caracterizar as células inflamatórias. Também são raras as descrições da presença de fluorescência nos vasos dos pacientes com PF^{115,116}. Interessantemente, observamos marcação IH das células endoteliais com todos os conjugados. Tal achado é plausível, uma vez que os autoanticorpos circulantes atingem a pele através dos vasos, em especial nos casos de PF com eritrodermia.

Assim, a IH poderia servir de ferramenta complementar para o diagnóstico, avaliação prognóstica e investigação de novos mecanismos fisiopatológicos das DBA. Uma grande vantagem da IH consiste na análise de amostras fixadas em formol e embebidas em parafina de modo similar ao processamento necessário para o preparo do tecido para coloração por HE e posterior análise em microscópio óptico. Cortes seriados da pele podem ser analisados através de duas técnicas simultaneamente¹⁵⁶, implicando em: maior conforto para o paciente, pois evita a necessidade de uma segunda biópsia para obtenção de um fragmento adicional de pele; dispensa da necessidade de transporte rápido do material em solução salina para criopreservação, ou do meio de Michel para conservar o tecido para seu subsequente preparo em um criostato por um técnico especializado¹⁴⁵.

A possibilidade de se realizar o estudo imuno-histoquímico em plataformas automatizadas é outra grande vantagem em relação à IF¹⁵⁶. A automatização da técnica diminui a variação interpessoal e interexperimental, e reduz possíveis diferenças na concentração e volume de cada reagente e anticorpo utilizado nas múltiplas etapas do processo⁵⁵, resultando em maior reprodutibilidade e rapidez no preparo de cada lâmina. Além disso, as técnicas atuais de IH incluem etapas de

recuperação antigênica e bloqueio da atividade da peroxidase endógena que aumentam a ligação específica entre o antígeno e o anticorpo primário, minimizando resultados falso-positivos¹⁴⁴.

Também é possível avaliar por IH a positividade de mais de um antígeno em um mesmo fragmento de pele, sem perda da antigenicidade do tecido ou interferência entre os anticorpos primários e cromógenos utilizados para revelar a reação¹⁴⁵. A dupla marcação por IF é mais difícil pela perda da intensidade do sinal após exposição à luz e por degradação espontânea com o tempo, por exemplo. Desse modo, a IH seria uma técnica mais adequada para avaliar se a positividade por imunoglobulinas e C3 na derme dos pacientes com PF é decorrente do reconhecimento de antígenos não-caderina pelos autoanticorpos produzidos na fase ativa da doença.

Outro aspecto relevante na comparação entre IH e IF é justamente a durabilidade do material analisado. Enquanto as lâminas de IH mantêm sua coloração, possibilitando o armazenamento em um banco de dados, as lâminas de IF possuem duração limitada em virtude da degradação dos probes de fluoresceína, dificultando seu uso para estudos retrospectivos¹⁴⁵ (Quadro 11).

Vale ressaltar que o advento de escâneres para digitalização das lâminas avaliadas por microscopia óptica ampliou as possibilidades de uso da IH. A imagem digitalizada pode ser disponibilizada em um banco de dados virtual, reduzindo a necessidade de um espaço físico para o armazenamento. Isso permite seu compartilhamento em tempo real com dermatopatologistas em diferentes regiões do mundo, que podem visualizar a lâmina virtual simultaneamente ou conforme sua conveniência. Com isso, reduz-se os custos necessários para o transporte do material ou preparo de novas lâminas para obter a avaliação de diferentes especialistas¹⁵⁷.

A digitalização da lâmina histopatológica também possibilita seu estudo completo. Isso é fundamental para evitar que a análise restrita a imagens de campos pré-selecionados interfira na interpretação do espécime, especialmente quando o tecido apresenta diversidade morfológica, o que pode induzir a uma conclusão diagnóstica incorreta¹⁵⁸.

Zoroquiain et al. publicaram em 2016 um relato de caso de melanoma conjuntival com extensão para a órbita que apresentava 4 padrões histológicos distintos no mesmo tumor. Se cada padrão fosse avaliado isoladamente, o paciente

poderia ter recebido 4 diagnósticos diferentes: melanoma maligno, hemangiopericitoma, carcinoma mal diferenciado e tumor neuroendócrino. A análise histopatológica minuciosa e completa do tecido complementada pelos estudos imuno-histoquímicos automatizados possibilitou a conclusão diagnóstica de melanoma maligno; o paciente recebeu tratamento adequado e não apresentou recidiva ou metástase após 7 anos de seguimento¹⁵⁸.

Tendo em vista que a demanda por exames histopatológicos tem aumentado progressivamente e requer interpretação rápida e com eficácia, a disponibilidade de programas automatizados para contagem do número de vasos, de células e de *pixels* em lâminas digitalizadas torna sua análise mais ágil, objetiva e reproduzível.

Pelas razões supracitadas, realizamos a avaliação automatizada do estudo imuno-histoquímico com anti-VEGF com o programa de contagem de *pixels*, e de anti-Eng, com o programa de contagem de vasos. Encontramos limitações para a interpretação automatizada da positividade do VEGF que resultaram em uma análise diferente da obtida com a avaliação manual, portanto menos objetiva. A presença de fragmentos de pele com dimensões totais distintas, com espessuras diferentes da epiderme e da derme, e a ausência de representação dos anexos em algumas amostras foram determinantes para essa discordância.

A análise por *pixels* baseia-se na contagem dos pontos que apresentam uma cor pré-definida e na avaliação de sua intensidade. Procuramos minimizar o efeito dos tamanhos diferentes das amostras através da pré-seleção de uma região com área total semelhante em todos os fragmentos de pele para então proceder a análise. Ainda assim, amostras com epiderme mais espessa apresentaram número de *pixels* proporcionalmente maior nessa região, superestimando a positividade total.

Em contrapartida, a avaliação da positividade com anti-Eng mostrou-se rápida e eficaz. A heterogeneidade da dimensão das amostras pôde ser revertida com o cálculo do número de vasos positivos com anti-Eng dividido pela área total analisada, pois somente as células endoteliais foram positivas com esse anticorpo.

Quadro 11 – Comparação entre a técnica de IFD vs. IH.

IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	IMUNO-HISTOQUÍMICA
amostra fresca ou criopreservada no meio de Michel	amostra fixada em formol e embebida em parafina
-----	plataforma automatizada disponível
armazenamento por curto período	armazenamento por longo período
técnico / dermatopatologista experiente	análise automatizada por software
necessidade de criostato	-----
técnica consagrada para diagnóstico de DBA	técnica em validação para o diagnóstico de DBA
excelente avaliação da epiderme; pouca visualização das estruturas dérmicas	visualização clara da arquitetura cutânea
-----	escâner para digitalização da lâmina

Legenda: DBA – doenças bolhosas autoimunes.

Propomos, aqui, considerar a gravidade do PF como o resultado de uma agressão continuada à pele associada a um processo de reparação ineficaz (Fluxograma 2). O controle da atividade do PF poderia ser obtido com a combinação de drogas inibidoras da produção de autoanticorpos, como os corticosteróides, os imunossupressores, e os imunobiológicos, a fim de interromper a formação de novas bolhas, e de medicações capazes de otimizar a cicatrização para restabelecimento da integridade cutânea.

Indicadores objetivos da qualidade de vida dos pacientes com DBA confirmam o impacto negativo dessas doenças nas atividades diárias, no trabalho e no campo psicossocial^{159,160}. O emprego de todos esses avanços tecnológicos no estudo das DBA beneficiará ainda mais os pacientes afetados por essas doenças raras e potencialmente devastadoras. Esperamos que as descobertas desse estudo contribuam para o melhor entendimento da fisiopatogenia do PF e para delinear uma estratégia terapêutica individualizada e eficaz que possibilite a remissão das lesões e proporcione alívio ao sofrimento dos pacientes afetados por essa doença.

Fluxograma 2 – Participação do VEGF e da Eng na patogênese do PFE.

Legenda: Níveis elevados de anti-Dsg1 causam maior dano tecidual e uma resposta reparadora com aumento do VEGF sérico e tecidual. A baixa expressão tecidual de Eng no PFE mostra que a desregulação da angiogênese contribui para a eritrodermia.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar a participação do *Staphylococcus aureus* e do vírus do herpes simples na evolução do pênfigo foliáceo.
- Avaliar a expressão dos marcadores angiogênicos em: (1) outras apresentações clínicas do pênfigo foliáceo; (2) outras dermatoses bolhosas autoimunes; (3) outras eritrodermias adquiridas.
- Ampliar a avaliação imuno-histoquímica com os anticorpos anti-IgG, -IgM, -IgA e -C3 na pele dos pacientes com pênfigo foliáceo e com outras doenças bolhosas autoimunes, e comparar a eficácia do método com a imunofluorescência direta.
- Desenvolver algoritmos para a análise automatizada da marcação imuno-histoquímica com anti-IgG, -IgM, -IgA e -C3.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. A ocorrência da eritrodermia no pêfigo foliáceo é mais comum na apresentação clínica inicial da doença, principalmente em mulheres. Trata-se de uma forma grave do pêfigo foliáceo, com risco aumentado de infecção da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* e de erupção variceliforme de Kaposi. A infecção pelo vírus do herpes simples está relacionada a internação mais prolongada.
2. Os pacientes com PF eritrodérmico apresentam maiores títulos de autoanticorpos anti-desmogleína 1 circulantes em relação à fase não-eritrodérmica.
3. O aumento do VEGF circulante indica uma resposta reparadora ao dano tecidual decorrente da produção aumentada dos autoanticorpos.
4. Os queratinócitos da epiderme aumentam significativamente a expressão do VEGF durante a fase eritrodérmica do PF em comparação à fase não-eritrodérmica. A proliferação vascular induzida pela elevação do VEGF tecidual não ocorre de maneira adequada, como demonstrada pela baixa expressão tecidual de endoglin durante a eritrodermia.
5. A expressão tecidual da endoglin no PF é diferente da observada no pêfigo vulgar e semelhante à psoríase, sugerindo que a desregulação da síntese de VEGF e de Eng contribuam para a patogênese da eritrodermia, manifestação clínica comum a ambas as doenças e não reportada no pêfigo vulgar.
6. A avaliação imuno-histoquímica demonstrou o depósito dos imunocomplexos entre os queratinócitos da epiderme, analogamente à distribuição observada com a técnica de imunofluorescência direta. Entre outras vantagens, a imuno-histoquímica identificou as estruturas dérmicas e a presença de autoanticorpos depositados nas células inflamatórias, vasos e anexos.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação imuno-histoquímica da expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de endoglinina (CD105) na pele de pacientes eritrodérmicos com pêmfigo foliáceo.

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 05172312.2.0000.0068

Pesquisador: Valeria Aoki

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 107.470

Data da Relatoria: 19/09/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto pode contribuir para a compreensão dos fatores envolvidos no processo de eritrodermia do pêmfigo foliáceo. A seção de introdução apresenta dados de literatura voltados a outras patologias (psoríase) que o pêmfigo sustentando a originalidade do trabalho. A seção material e métodos está bem detalhada demonstrando o expertise do grupo.

Objetivo da Pesquisa:

Moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas inflamatórias podem estar envolvidas na fisiopatologia da eritrodermia. O projeto visa avaliar o material biológico armazenado de biópsias cutâneas obtidas durante o quadro de eritrodermia de pacientes eritrodérmicos com pêmfigo foliáceo quanto à expressão de: 1.fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)(associado à angiogênese e aumento da permeabilidade vascular); 2.endoglinina ou CD105 (associada ao aumento da permeabilidade vascular periférica a células inflamatória e ao desenvolvimento de lesões de psoríase). Como controle serão incluídos espécimes de 10 pacientes com pêmfigo vulgar e de 10 controles sadios.Todas as reações imuno-histoquímicas serão realizadas no Laboratório do Instituto de Medicina Tropical e Laboratório de Investigação Médica 56, do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, a análise será feita utilizando fragmentos de pele embebidos em parafina obtidos previamente para fins de diagnóstico e armazenados no Departamento de Dermatologia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é de interesse pois não há até o momento dados de literatura sobre a associação desses marcadores biológicos na fisiopatologia da eritrodermia no pêmfigo foliáceo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

Sugestão: se houvesse disponibilidade de amostras plasmáticas obtidas à época da biópsia e estocadas adequadamente, os pesquisadores poderiam avaliar também os níveis dos marcadores.

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

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-6442

Fax: (11)2661-6442

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto envolve análise de material biológico armazenado e não apresenta pendências éticas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 26 de Setembro de 2012

Assinado por:
Luiz Eugênio Garcez Leme

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-6442 **Fax:** (11)2661-6442 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8.2 Anexo 2 – Dados demográficos e laboratoriais dos pacientes de PFE.

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS						HISTOPATOLÓGICO		IMUNOFLUORESCÊNCIA				
PACIENTE	PFE AO DX	GÊNERO	IDADE	COR	PROCEDÊNCIA	ACANTÓLISE	LOCALIZAÇÃO	IgG	C3	IgM	IgA	INDIRETA
PF-1	sim	F	50	BR	Condeúba (BA)	sim	alta	1	1	0	0	1/5120
PF-2	sim	F	26	NE	São Paulo (SP)	sim	alta	2	2	0	0	1/2560
PF-3	sim	F	65	BR	Paulistânia (SP)	sim	alta	2	2	0	0	1/2560
PF-4	sim	F	19	BR	Manga (MG)	sim	alta	1	1 (E) 1 (ZMB)	1 (ZMB)	0	1/1280
PF-5	sim	F	37	PD	Belo Horizonte (MG)	sim	subcórnea	1	0	0	0	1/2560
PF-6	sim	M	5	BR	Patos de Minas (MG)	sim	subcórnea	1	1	0	0	>1/5120
PF-7	sim	M	50	BR	Taubaté (SP)	sim	subcórnea	2	1 (E) 1 (ZMB)	0	0	>1/5120
PF-8	sim	F	52	BR	Ribeirão do Pinhal (PR)	sim	subcórnea	1	0	0	0	1/2560
PF-9	sim	F	54	BR	Silvianópolis (MG)	sim	intragranulosa	2	1	0	0	1/5120
PF-10	sim	F	47	BR	São Paulo (SP)	sim	intragranulosa	1	1 (E) 1 (ZMB)	1 (ZMB)	1 (ZMB)	>1/5120
PF-11	sim	F	38	BR	Itabuna (BA)	sim	alta	1	1	0	0	1/2560

continua

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS					HISTOPATOLÓGICO			IMUNOFLUORESCÊNCIA				
PACIENTE	PFE AO DX	GÊNERO	IDADE	COR	PROCEDÊNCIA	ACANTÓLISE	LOCALIZAÇÃO	IgG	C3	IgM	IgA	INDIRETA
PF-12	sim	F	11	BR	Itu (SP)	sem amostra na fase eritrodérmica			sem IFD na fase eritrodérmica			>1/5120
PF-13	não	M	67	BR	Bragança Paulista (SP)	sim	subcórnea	1	1	0	0	>1/5120
PF-14	sim	M	16	PD	Piracicaba (SP)	sim	subcórnea	2	0	0	0	1/5120
PF-15	sim	M	19	BR	Itabira (MG)	sim	subcórnea	1	1	0	0	1/2560
PF-16	sim	M	49	NE	Piratuba (SC)	sim	intragranulosa	1	1	0	0	>1/5120
PF-17	não	M	54	NE	Urucuca (BA)	sim	alta	1	1	0	0	1/2560
PF-18	não	F	72	BR	Piui (MG)	não	pústula subcórnea	2	0	0	0	>1/5120
PF-19	sim	F	43	BR	Orlândia (SP)	sim	subcórnea	1	1 (ZMB)	1 (ZMB)	0	1/1280
PF-20	sim	F	37	NE	Carlos Chagas (MG)	sim	alta	2	1	1 (ZMB)	0	1/2560
PF-21	sim	F	41	PD	Ibiporinha (PR)	sim	subcórnea	1	1	0	0	1/2560
PF-22	sim	F	56	BR	Miracatu (SP)	sim	subcórnea	1	1	0	0	1/2560

continuação

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS					HISTOPATOLÓGICO			IMUNOFLUORESCÊNCIA				
PACIENTE	PFE AO DX	GÊNERO	IDADE	COR	PROCEDÊNCIA	ACANTÓLISE	LOCALIZAÇÃO	IgG	C3	IgM	IgA	INDIRETA
PF-23	sim	F	59	BR	Santa Isabel (SP)	sim	subcórnea	2	2	0	0	1/2560
PF-24	não	F	31	BR	São Sebastião do Passe (BA)	não	pústula espongiforme	2	1	0	0	1/5120
PF-25	não	F	36	PD	Divisa Nova (MG)	sem amostra na fase eritrodérmica		sem IFD na fase eritrodérmica				1/5120
PF-26	sim	F	21	PD	Padre Paraíso (MG)	sim	subcórnea	1	1 (E) 1 (ZMB)	0	0	>1/5120
PF-27	sim	M	62	BR	Água Preta (PE)	sim	alta	1	1 (E) 2 (ZMB)	0	0	>1/5120
PF-28	não	F	62	BR	Januária (MG)	sem amostra na fase eritrodérmica		sem IFD na fase eritrodérmica				1/1280
PF-29	sim	F	48	BR	Chavantes (SP)	sim	subcórnea	1	1	0	0	1/2560
PF-30	sim	F	28	PD	Itariri (SP)	sim	subcórnea	2	1 (E) 1 (ZMB)	0	0	1/1280
PF-31	sim	F	69	BR	São Paulo (SP)	sim	subcórnea	1	1	0	0	>1/5120
TOTAL (%)	25 (83,3)	F: 23 (73,7) M: 8 (26,7)	42,7 ± 18,1	21 BR (67,8) 4 NE (12,9) 6 MU (19,3)	BA: 4; MG: 10 PE: 1; PR: 2 SC: 1; SP: 13	26/28 (92,8)	15 subcórnea (53,6) 8 alta (28,6) 3 intragranulosa (10,7)	28 E (100,0)	24 E (85,7) 7 ZMB (25,0)	4 ZMB (14,3)	1 ZMB (3,6)	1/1280 (12,9%)
												1/2560 (38,7%)
												1/5120 (16,1%)
												>1/5120 (32,3%)

Legenda: BR – pele branca; E – epiderme; NE – pele negra; PF – pênfigo foliáceo; PD – pele parda; *PFE ao Dx – paciente com eritrodermia no momento do diagnóstico de PF; ZMB – zona da membrana basal.

conclusão

8.3 Anexo 3 – Dados referentes à internação hospitalar dos pacientes de PFE.

PACIENTE	IHP (DIAS)	TRATAMENTO					INFECÇÕES		
		PREDNISONA (mg/kg/d)		CTC TÓPICO	IMS	IMD	BACT (PELE)	INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA	HSV (PELE)
		INÍCIO	MÁXIMO						
PF-1	14	1,54	1,54	sim	não	DDS	não	não	não
PF-2	42	0,65	1,63	sim	não	não	sim	não	não
PF-3	45	0,89	1,79	sim	não	não	sim	<i>Escherichia coli</i>	sim
PF-4	17	0,00	1,50	não	não	não	sim	não	não
PF-5	44	0,61	1,43	sim	não	não	sim	não	sim
PF-6	156	1,43	2,14	sim	AZA	não	sim	não	não
PF-7	62	0,82	1,36	sim	MMF	não	sim	<i>Staphylococcus aureus</i>	não
PF-8	12	0,73	0,73	sim	não	não	sim	não	não
PF-9	33	0,00	1,07	não	não	não	sim	não	sim
PF-10	64	1,40	1,40	sim	não	PIMEC	sim	não	sim
PF-11	9	0,92	1,32	não	não	não	sim	não	não
PF-12	20	1,00	1,00	não	não	não	sim	<i>Staphylococcus aureus</i>	não

continua

PACIENTE	IHP (DIAS)	TRATAMENTO					INFECÇÕES		
		PREDNISONA (mg/kg/d)		CTC TÓPICO	IMS	IMD	BACT (PELE)	INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA	HSV (PELE)
		INÍCIO	MÁXIMO						
PF-13	31	1,51	1,89	sim	não	não	sim	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	sim
PF-14	20	1,50	1,50	não	não	não	sim	<i>Staphylococcus aureus</i>	não
PF-15	21	1,48	1,48	sim	não	não	sim	não	não
PF-16	60	0,91	1,02	sim	não	não	sim	<i>Staphylococcus aureus</i>	sim
PF-17	31	0,98	1,31	não	não	TETRA	sim	não	não
PF-18	13	1,37	1,37	não	não	não	sim	não	não
PF-19	9	0,76	0,76	não	não	não	sim	não	não
PF-20	18	1,19	1,19	não	não	não	sim	não	sim
PF-21	40	0,84	1,40	sim	MMF	não	sim	não	sim
PF-22	36	0,59	1,47	sim	não	não	sim	não	sim
PF-23	6	1,06	1,06	não	não	não	sim	não	não
PF-24	23	0,32	0,79	sim	não	não	sim	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	não

continuação

PACIENTE	IHP (DIAS)	TRATAMENTO					INFECÇÕES		
		PREDNISONA (mg/kg/d)		CTC TÓPICO	IMS	IMD	BACT (PELE)	INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA	HSV (PELE)
		INÍCIO	MÁXIMO						
PF-25	190	0,83	1,67	não	CIC	não	sim	<i>Staphylococcus aureus</i>	sim
PF-26	12	0,92	0,92	sim	não	não	sim	não	não
PF-27	70	1,27	1,27	sim	AZA	não	sim	<i>Staphylococcus aureus; Enterococcus faecalis; Serratia marcescens</i>	sim
PF-28	51	0,99	0,99	não	não	não	sim	não	não
PF-29	21	1,21	1,21	não	não	não	sim	não	não
PF-30	36	0,96	0,96	sim	não	não	sim	não	não
PF-31	71	0,95	1,90	sim	não	não	sim	<i>Staphylococcus aureus; Enterococcus faecalis</i>	não
TOTAL PF (%)	41,2 ± 40,2	1,03 ± 0,36	1,32 ± 0,35	10 (32,3)	5 (16,1)	3 (9,7)	30 (96,7)	10 (32,2)	11 (35,5)

Legenda: AZA – azatioprina; BACT – bactéria; CIC – ciclosporina; CTC – corticosteróide; DDS – dapsona; HSV – vírus do herpes simples; IHP – duração da internação hospitalar; IMD – imunomodulador; IMS – imunossupressor; MMF – micofenolato de mofetila; PF – pênfigo foliáceo; PFE – pênfigo foliáceo na fase eritrodérmica; PIMEC – pimecrolimo; TETRA – tetraciclina.

conclusão

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Bystryn JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet* 2005;366:61-73.
2. Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clinics in dermatology* 2011;29:432-6.
3. King DF, Holubar K. History of pemphigus. *Clinics in dermatology* 1983;1:6-12.
4. Buzina DS, Marinovic B. From pemphix to desmogleins. *Clinics in dermatology* 2011;29:355-9.
5. Alpsy E, Akman-Karakas A, Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 2015;307:291-8.
6. James KA, Culton DA, Diaz LA. Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin* 2011;29:405-12, viii.
7. Culton DA, Qian Y, Li N, et al. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 2008;31:311-24.
8. Flores G, Qian Y, Diaz LA. The enigmatic autoimmune response in endemic pemphigus foliaceus. *Actas dermo-sifiliograficas* 2009;100 Suppl 2:40-8.
9. Aoki V, Sousa JX, Jr., Diaz LA, Cooperative Group on Fogo Selvagem R. Pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin* 2011;29:413-8, viii.
10. Aoki V, Rivitti EA, Diaz LA, Cooperative Group on Fogo Selvagem R. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. *J Dermatol* 2015;42:18-26.
11. Qian Y, Jeong JS, Abdeladhim M, et al. IgE anti-LJM11 sand fly salivary antigen may herald the onset of fogo selvagem in endemic Brazilian regions. *J Invest Dermatol* 2015;135:913-5.
12. Qian Y, Prisayanh P, Andraca E, et al. IgE, IgM, and IgG4 anti-desmoglein 1 autoantibody profile in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Invest Dermatol* 2011;131:985-7.
13. Furue M, Kadono T. Pemphigus, a pathomechanism of acantholysis. *Australas J Dermatol* 2017.
14. Qian Y, Jeong JS, Maldonado M, et al. Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. *J Immunol* 2012;189:1535-9.

-
15. Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and cell biology* 2008;130:21-54.
 16. Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, Stanley JR. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:536-43.
 17. Bolognia JL, Jorizzo JL, Schaffer J. *Dermatology: 2-Volume Set: Expert Consult Premium Edition-Enhanced Online Features and Print*. Philadelphia: Saunders; 2012.
 18. van der Wier G, Jonkman MF, Pas HH, Diercks GF. Ultrastructure of acantholysis in pemphigus foliaceus re-examined from the current perspective. *Br J Dermatol* 2012;167:1265-71.
 19. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:461-8.
 20. Seshadri D, Kumaran MS, Kanwar AJ. Acantholysis revisited: back to basics. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* 2013;79:120-6.
 21. Aithal V, Kini U, Jayaseelan E. Role of direct immunofluorescence on Tzanck smears in pemphigus vulgaris. *Diagnostic cytopathology* 2007;35:403-7.
 22. Grando SA. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity* 2012;45:7-35.
 23. Yoshida K, Ishii K, Shimizu A, et al. Non-pathogenic pemphigus foliaceus (PF) IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. *Journal of dermatological science* 2017;85:197-207.
 24. Heupel WM, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol* 2008;181:1825-34.
 25. Waschke J, Bruggeman P, Baumgartner W, Zillikens D, Drenckhahn D. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest* 2005;115:3157-65.
 26. Baum S, Sakka N, Artsi O, Trau H, Barzilai A. Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. *Autoimmunity reviews* 2014;13:482-9.
 27. Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmunity reviews* 2010;10:84-9.
 28. Rothe MJ, Bernstein ML, Grant-Kels JM. Life-threatening erythroderma: diagnosing and treating the "red man". *Clinics in dermatology* 2005;23:206-17.
 29. Sehgal VN, Srivastava G, Sardana K. Erythroderma/exfoliative dermatitis: a synopsis. *International journal of dermatology* 2004;43:39-47.

-
30. Rym BM, Mourad M, Bechir Z, et al. Erythroderma in adults: a report of 80 cases. *International journal of dermatology* 2005;44:731-5.
 31. Alonso-Llamazares J, Dietrich SM, Gibson LE. Bullous pemphigoid presenting as exfoliative erythroderma. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:827-30.
 32. Amato L, Gallerani I, Mei S, Pestelli E, Caproni M, Fabbri P. Erythrodermic bullous pemphigoid. *International journal of dermatology* 2001;40:343-6.
 33. Tappeiner G, Konrad K, Holubar K. Erythrodermic bullous pemphigoid. Report of a case. *J Am Acad Dermatol* 1982;6:489-92.
 34. Miyamoto D, Batista DI, Santi CG, Maruta CW, Delgado L, Aoki V. Exfoliative erythroderma as a clinical manifestation of autoimmune bullous diseases. *International journal of dermatology* 2016;55:e112-4.
 35. Huet F, Karam A, Lemasson G, et al. Image Gallery: Erythroderma revealing a nonbullous bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2016;175:e136-e7.
 36. Vasconcellos C, Domingues PP, Aoki V, Miyake RK, Sauaia N, Martins JE. Erythroderma: analysis of 247 cases. *Revista de saude publica* 1995;29:177-82.
 37. Li J, Zheng HY. Erythroderma: a clinical and prognostic study. *Dermatology* 2012;225:154-62.
 38. Pal S, Haroon TS. Erythroderma: a clinico-etiological study of 90 cases. *International journal of dermatology* 1998;37:104-7.
 39. Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;117:505-10.
 40. Arbache ST, Nogueira TG, Delgado L, Miyamoto D, Aoki V. Immunofluorescence testing in the diagnosis of autoimmune blistering diseases: overview of 10-year experience. *An Bras Dermatol* 2014;89:885-9.
 41. Buch AC, Kumar H, Panicker N, Misal S, Sharma Y, Gore CR. A Cross-sectional Study of Direct Immunofluorescence in the Diagnosis of Immunobullous Dermatoses. *Indian journal of dermatology* 2014;59:364-8.
 42. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:803-22; quiz 22-4.
 43. Patel AN, Simpson RC, Cohen SN. In a patient with an immunobullous disorder, is transportation of the skin biopsy in normal saline adequate for direct immunofluorescence analysis? A critically appraised topic. *Br J Dermatol* 2013;169:6-10.
 44. Cram DL, Fukuyama K. Immunohistochemistry of ultraviolet-induced pemphigus and pemphigoid lesions. *Archives of dermatology* 1972;106:819-24.

45. Miyamoto C, Mattos Neto RB, Cesare SD, Belfort Junior R, Burnier MN, Jr. Use of CD25 as an immunohistochemical marker for acquired ocular toxoplasmosis. *Arq Bras Oftalmol* 2010;73:443-6.
46. Jagan L, Zoroquiain P, Bravo-Filho V, Logan P, Qutub M, Burnier MN, Jr. Sebaceous adenomas of the eyelid and Muir-Torre Syndrome. *Br J Ophthalmol* 2015;99:909-13.
47. Arean C, Orellana ME, Abourbih D, Abreu C, Pifano I, Burnier MN, Jr. Expression of vascular endothelial growth factor in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2010;128:223-9.
48. Mungle T, Tewary S, Arun I, et al. Automated characterization and counting of Ki-67 protein for breast cancer prognosis: A quantitative immunohistochemistry approach. *Comput Methods Programs Biomed* 2017;139:149-61.
49. Clark I, Torbenson MS. Immunohistochemistry and Special Stains in Medical Liver Pathology. *Adv Anat Pathol* 2017;24:99-109.
50. Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, et al. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *J Thorac Oncol* 2017;12:334-46.
51. Giannico GA, Arnold SA, Gellert LL, Hameed O. New and Emerging Diagnostic and Prognostic Immunohistochemical Biomarkers in Prostate Pathology. *Adv Anat Pathol* 2017;24:35-44.
52. Braun-Falco M, Schempp W, Weyers W. Molecular diagnosis in dermatopathology: what makes sense, and what doesn't. *Exp Dermatol* 2009;18:12-23.
53. Molina-Ruiz AM, Cerroni L, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous bacterial infections. *Am J Dermatopathol* 2015;37:179-93; quiz 94-6.
54. Kim RH, Meehan SA. Immunostain use in the diagnosis of melanomas referred to a tertiary medical center: a 15-year retrospective review (2001-2015). *J Cutan Pathol* 2017;44:221-7.
55. Prichard JW. Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1578-82.
56. Van Eycke YR, Allard J, Salmon I, Debeir O, Decaestecker C. Image processing in digital pathology: an opportunity to solve inter-batch variability of immunohistochemical staining. *Sci Rep* 2017;7:42964.
57. Zoroquiain P, Logan P, Bravo-Filho V, et al. Diagnosing Pathological Prognostic Factors in Retinoblastoma: Correlation between Traditional Microscopy and Digital Slides. *Ocul Oncol Pathol* 2015;1:259-65.

-
58. Villani AP, Chouvet B, Kanitakis J. Application of C4d Immunohistochemistry on Routinely Processed Tissue Sections for the Diagnosis of Autoimmune Bullous Dermatoses. *Am J Dermatopathol* 2016;38:186-8.
59. Zhang X, Hyjek E, Soltani K, Petronic-Rosic V, Shea CR. Immunohistochemistry for immunoglobulin G4 on paraffin sections for the diagnosis of pemphigus. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:1402-7.
60. Abe T, Maruyama S, Babkair H, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Simultaneous immunolocalization of desmoglein 3 and IgG4 in oral pemphigus vulgaris: IgG4 predominant autoantibodies in its pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2015;44:850-6.
61. Glauser S, Rutz M, Cazzaniga S, Hegyi I, Borradori L, Beltraminelli H. Diagnostic value of immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens for bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2016.
62. Aoki V, Sousa JX, Jr., Fukumori LM, Perigo AM, Freitas EL, Oliveira ZN. Direct and indirect immunofluorescence. *An Bras Dermatol* 2010;85:490-500.
63. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmunity reviews* 2014;13:477-81.
64. Weiss D, Ristl R, Griss J, et al. Autoantibody Levels and Clinical Disease Severity in Patients with Pemphigus: Comparison of Aggregated Anti-desmoglein ELISA Values and Indirect Immunofluorescence Titres. *Acta Derm Venereol* 2015;95:559-64.
65. Mavropoulos A, Orfanidou T, Liaskos C, et al. p38 MAPK Signaling in Pemphigus: Implications for Skin Autoimmunity. *Autoimmune Dis* 2013;2013:728529.
66. Creamer D, Allen MH, Groves RW, Barker JN. Circulating vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in erythroderma. *Lancet* 1996;348:1101.
67. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
68. Bae ON, Noh M, Chun YJ, Jeong TC. Keratinocytic vascular endothelial growth factor as a novel biomarker for pathological skin condition. *Biomol Ther (Seoul)* 2015;23:12-8.
69. Li W, Man XY, Chen JQ, Zhou J, Cai SQ, Zheng M. Targeting VEGF/VEGFR in the treatment of psoriasis. *Discovery medicine* 2014;18:97-104.
70. Wise LM, Inder MK, Real NC, Stuart GS, Fleming SB, Mercer AA. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cell Microbiol* 2012;14:1376-90.

-
71. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol* 2014;5:75.
72. Salven P, Hattori K, Heissig B, Rafii S. Interleukin-1 α promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002;16:1471-3.
73. Salgado R, Benoy I, Bogers J, et al. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001;4:37-43.
74. Salgado R, Benoy I, Dirix L, Vermeulen P, Van Marck E. Importance of platelets in VEGF-mediated angiogenesis in tumors. *FEBS letters* 2002;520:182.
75. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956-64.
76. Elias PM, Arbiser J, Brown BE, et al. Epidermal vascular endothelial growth factor production is required for permeability barrier homeostasis, dermal angiogenesis, and the development of epidermal hyperplasia: implications for the pathogenesis of psoriasis. *The American journal of pathology* 2008;173:689-99.
77. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol* 2002;29:585-9.
78. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology* 1995;146:1029-39.
79. Kunstfeld R, Hirakawa S, Hong YK, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 2004;104:1048-57.
80. Micali G, Lacarrubba F, Musumeci ML, Massimino D, Nasca MR. Cutaneous vascular patterns in psoriasis. *International journal of dermatology* 2010;49:249-56.
81. Nofal A, Al-Makhzangy I, Attwa E, Nassar A, Abdalmoati A. Vascular endothelial growth factor in psoriasis: an indicator of disease severity and control. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23:803-6.
82. Zhang Y, Matsuo H, Morita E. Increased production of vascular endothelial growth factor in the lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 2006;297:425-9.
83. Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Content of vascular endothelial growth factor in stratum corneum well correlates to local severity of acute inflammation in patients with atopic dermatitis. *International archives of allergy and immunology* 2012;157:251-8.

84. Man XY, Yang XH, Cai SQ, Bu ZY, Zheng M. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on keratinocytes in psoriasis: regulated by calcium independent of VEGF. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008;12:649-60.
85. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer* 2011;2:1097-105.
86. Ruffini F, Failla CM, Orecchia A, et al. Expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in cutaneous melanoma: role in tumour progression. *The British journal of dermatology* 2011;164:1061-70.
87. Ameglio F, D'Auria L, Cordiali-Fei P, et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: correlated behaviour of serum VEGF, sE-selectin and TNF-alpha levels. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 1997;11:148-53.
88. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 2011;31:2283-90.
89. Liu Z, Lebrin F, Maring JA, et al. ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PLoS One* 2014;9:e86273.
90. Dassoulas K, Gazouli M, Theodoropoulos G, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2010;136:703-8.
91. Inaloz HS, Evereklioglu C, Unal B, Kirtak N, Eralp A, Inaloz SS. The significance of immunohistochemistry in the skin pathergy reaction of patients with Behcet's syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:56-61.
92. van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM, De Jong EM. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* 1998;78:19-21.
93. Mimouni D, Bar H, Gdalevich M, Katzenelson V, David M. Pemphigus, analysis of 155 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:947-52.
94. Meurer M. Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clinics in dermatology* 2012;30:78-83.
95. Atzmony L, Hodak E, Gdalevich M, Rosenbaum O, Mimouni D. Treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Dermatol* 2014;15:503-15.
96. Lehman JS, Murrell DF, Camilleri MJ, Kalaaji AN. Infection and infection prevention in patients treated with immunosuppressive medications for autoimmune bullous disorders. *Dermatol Clin* 2011;29:591-8.

-
97. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 2009;9:10-25.
98. Tzu J, Kim N, Kirsner RS. Why rituximab works. *The Journal of investigative dermatology* 2008;128:2744.
99. Mouquet H, Musette P, Gougeon ML, et al. B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *The Journal of investigative dermatology* 2008;128:2859-69.
100. Borradori L, Lombardi T, Samson J, Girardet C, Saurat JH, Hugli A. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) for refractory erosive stomatitis secondary to CD20(+) follicular lymphoma-associated paraneoplastic pemphigus. *Archives of dermatology* 2001;137:269-72.
101. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *The Lancet*.
102. de Sena Nogueira Maehara L, Huizinga J, Jonkman MF. Rituximab therapy in pemphigus foliaceus: report of 12 cases and review of recent literature. *Br J Dermatol* 2015;172:1420-3.
103. Huang A, Madan RK, Levitt J. Future therapies for pemphigus vulgaris: Rituximab and beyond. *J Am Acad Dermatol* 2016;74:746-53.
104. Viac J, Palacio S, Schmitt D, Claudy A. Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1997;289:158-63.
105. Kumar I, Staton CA, Cross SS, Reed MW, Brown NJ. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds. *Br J Surg* 2009;96:1484-91.
106. Akhyani M, Ghodsi ZS, Toosi S, Dabbaghian H. Erythroderma: a clinical study of 97 cases. *BMC dermatology* 2005;5:5.
107. Torres-Camacho P, Tirado-Sanchez A, Ponce-Olivera RM. Erythroderma: clinical and laboratory follow up of 66 Mexican patients. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* 2009;75:522-3.
108. Gonzalez F, Saenz AM, Cirocco A, Tacaronte IM, Fajardo JE, Calebotta A. Endemic pemphigus foliaceus in Venezuela: report of two children. *Pediatr Dermatol* 2006;23:132-5.
109. Fariba G, Ayatollahi A, Hejazi S. Pemphigus foliaceus. *Indian Pediatr* 2012;49:240-1.

110. Nousari HC, Moresi M, Klapper M, Anhalt GJ. Nonendemic pemphigus foliaceus presenting as fatal bullous exfoliative erythroderma. *Cutis* 2001;67:251-2.
111. Connelly EA, Aber C, Kleiner G, Nousari C, Charles C, Schachner LA. Generalized erythrodermic pemphigus foliaceus in a child and its successful response to rituximab treatment. *Pediatr Dermatol* 2007;24:172-6.
112. Miyakura T, Yamamoto T, Okubo Y, et al. Pemphigus foliaceus with prominent neutrophilic pustules initially presenting as erythroderma. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:e46-9.
113. Grekin SJ, Fox MC, Gudjonsson JE, Fullen DR. Psoriasiform pemphigus foliaceus: a report of two cases. *J Cutan Pathol* 2012;39:549-53.
114. Sarnoff DS, DeFeo CP. Coexistence of pemphigus foliaceus and mycosis fungoides. *Archives of dermatology* 1985;121:669-72.
115. Cozzani E, Balestrero S, Parodi A, Rebora A. Erythroderma with pemphigus immunofluorescence. An erythrodermic variant of pemphigus? *International journal of dermatology* 1999;38:207-8.
116. Peterson JD, Worobec SM, Chan LS. An erythrodermic variant of pemphigus foliaceus with puzzling histologic and immunopathologic features. *J Cutan Med Surg* 2007;11:179-84.
117. Wananukul S, Pongprasit P. Childhood pemphigus. *International journal of dermatology* 1999;38:29-35.
118. Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, et al. Pemphigus: analysis of 1209 cases. *International journal of dermatology* 2005;44:470-6.
119. Brenner S, Sasson A, Sharon O. Pemphigus and infections. *Clinics in dermatology* 2002;20:114-8.
120. Sagi L, Sherer Y, Trau H, Shoenfeld Y. Pemphigus and infectious agents. *Autoimmunity reviews* 2008;8:33-5.
121. de Paula Samorano-Lima L, Quiterio LM, Sanches JA, Jr., Neto CF. Inpatient dermatology: profile of patients and characteristics of admissions to a tertiary dermatology inpatient unit in Sao Paulo, Brazil. *International journal of dermatology* 2014;53:685-91.
122. Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:67-72.
123. Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, et al. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2000;30:994-1000.

124. Handler MZ, Schwartz RA. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:1418-23.
125. Amagai M, Stanley JR. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol* 2012;132:776-84.
126. Elston DM, Stratman EJ, Miller SJ. Skin biopsy: Biopsy issues in specific diseases. *J Am Acad Dermatol* 2016;74:1-16; quiz 7-8.
127. Orfali RL, Sato MN, Takaoka R, et al. Atopic dermatitis in adults: evaluation of peripheral blood mononuclear cells proliferation response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B and analysis of interleukin-18 secretion. *Exp Dermatol* 2009;18:628-33.
128. Warren SJ, Arteaga LA, Rivitti EA, et al. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 2003;120:104-8.
129. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:2059-81.
130. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:385-403.
131. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2015;173:370-8.
132. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol* 2016;100:979-84.
133. Bose D, Meric-Bernstam F, Hofstetter W, Reardon DA, Flaherty KT, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor targeted therapy in the perioperative setting: implications for patient care. *Lancet Oncol* 2010;11:373-82.
134. Christoforidis J, Ricketts R, Pratt C, et al. The effect of intravitreal anti-VEGF agents on peripheral wound healing in a rabbit model. *Clin Ophthalmol* 2012;6:61-9.
135. Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, et al. Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 2003;22:5976-85.
136. Perez-Gomez E, Jerkic M, Prieto M, et al. Impaired wound repair in adult endoglin heterozygous mice associated with lower NO bioavailability. *J Invest Dermatol* 2014;134:247-55.
137. Santi CG, Sotto MN. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Am Acad Dermatol* 2001;44:446-50.

-
138. Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, et al. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 1997;99:31-40.
139. Giordano CN, Sinha AA. Cytokine networks in Pemphigus vulgaris: An integrated viewpoint. *Autoimmunity* 2012;45:427-39.
140. Lakshmi MJ, Jaisankar TJ, Rajappa M, et al. Correlation of antimuscarinic acetylcholine receptor antibody titers and antidesmoglein antibody titers with the severity of disease in patients with pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2017.
141. Grando SA, Zelickson BD, Kist DA, et al. Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization. *J Invest Dermatol* 1995;104:95-100.
142. Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, Grando SA. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res* 2007;313:3542-55.
143. Jukic IL, Marinovic B. Significance of immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clinics in dermatology* 2011;29:389-97.
144. Schacht V, Kern JS. Basics of immunohistochemistry. *J Invest Dermatol* 2015;135:e30.
145. Yan J, Catts VS, Chan A, McCombe PA. A simple and reliable immunohistochemical method for colocalization of 2 antigens in the same cells of paraffin-embedded tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013;21:471-7.
146. Tsuruta D, Ishii N, Hamada T, et al. IgA pemphigus. *Clinics in dermatology* 2011;29:437-42.
147. Hashimoto T. Immunopathology of IgA pemphigus. *Clinics in dermatology* 2001;19:683-9.
148. Hashimoto T, Teye K, Ishii N. Clinical and immunological studies of 49 cases of various types of intercellular IgA dermatosis and 13 cases of classical subcorneal pustular dermatosis examined at Kurume University. *Br J Dermatol* 2017;176:168-75.
149. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *Journal of dermatological science* 2001;26:55-61.
150. Mentink LF, de Jong MC, Kloosterhuis GJ, Zuiderveen J, Jonkman MF, Pas HH. Coexistence of IgA antibodies to desmogleins 1 and 3 in pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus and paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 2007;156:635-41.
151. Cozzani E, Drosera M, Parodi A, Carrozzo M, Gandolfo S, Rebora A. Frequency of IgA antibodies in pemphigus, bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid. *Acta Derm Venereol* 2004;84:381-4.

152. Geller S, Gat A, Zeeli T, et al. The expanding spectrum of IgA pemphigus: a case report and review of the literature. *Br J Dermatol* 2014;171:650-6.
153. Wu H, Stanley JR, Cotsarelis G. Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol* 2003;120:1052-7.
154. Ramos W, Chacon GR, Galarza C, Gutierrez EL, Smith ME, Ortega-Loayza AG. Endemic pemphigus in the Peruvian Amazon: epidemiology and risk factors for the development of complications during treatment. *An Bras Dermatol* 2012;87:838-45.
155. Maragno L, Bussato WM, Maruta CW, et al. Characterization of the humoral and in situ autoantibody profile of scalp involvement in pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:e57-e9.
156. Troxell ML, Weintraub LA, Higgins JP, Kambham N. Comparison of C4d immunostaining methods in renal allograft biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:583-91.
157. Griffin J, Treanor D. Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back? *Histopathology* 2017;70:134-45.
158. Zoroquiain P, Nayman T, Fernandes B, Burnier MN. Conjunctival Melanoma With Morphologic Diversity and Orbital Invasion. *Am J Dermatopathol* 2016;38:e52-6.
159. Heelan K, Hitzig SL, Knowles S, et al. Loss of Work Productivity and Quality of Life in Patients With Autoimmune Bullous Dermatoses. *J Cutan Med Surg* 2015;19:546-54.
160. Sebaratnam DF, McMillan JR, Werth VP, Murrell DF. Quality of life in patients with bullous dermatoses. *Clinics in dermatology* 2012;30:103-7.