

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

CELINA MATOS DE ALBUQUERQUE

**EXPRESSÃO DOS LINFÓCITOS CD4+CD25+
(CÉLULAS T REGULADORAS) NOS PÊNFIGOS**

Ribeirão Preto

2014

CELINA MATOS DE ALBUQUERQUE

**EXPRESSÃO DOS LINFÓCITOS CD4+CD25+
(CÉLULAS T REGULADORAS) NOS PÊNFIGOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas
do Programa de Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Albuquerque, Celina Matos de

Expressão dos Linfócitos CD4+CD25+ (Células T Reguladoras) nos Pênfigos / Celina Matos de Albuquerque; orientadora Ana Maria Ferreira Roselino. – Ribeirão Preto, 2014.

129 f.: il.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Clínica Médica

1. Pênfigo. 2. Células T regulatórias. 3. Treg. 4. Imunologia.

CELINA MATOS DE ALBUQUERQUE

Expressão dos Linfócitos CD4+CD25+ (Células T Reguladoras) nos Pênfigos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas do Programa de Clínica Médica.

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Jovina e Nazareno

Pelo apoio e amor incondicionais, pelo incentivo aos estudos, por me ensinarem os valores familiares e por transformarem em seus os meus sonhos.

Sem dúvida essa conquista é também de vocês. Muito obrigada por tudo.

Ao meu marido, Liêvin

Pela paciência, companheirismo, carinho e compreensão, meu grande suporte nessa jornada. Ao seu lado tudo faz mais sentido, sou mais confiante e dou o meu melhor sem esforço. Obrigada por deixar tudo mais simples, e os meus dias, muito mais felizes.

Com amor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

Por ter contribuído imensamente para minha formação profissional. Pela generosidade, paciência, ensinamentos e conselhos.

Por acreditar em mim desde o início.

Obrigada.

Agradecimentos

A Deus que sempre me deu força e coragem para continuar seguindo meus objetivos, que me trouxe até aqui e há sempre de guiar meus caminhos.

Aos meus pais, irmãos e familiares, que sempre estiveram ao meu lado e dispostos a oferecer todo amor, amizade, carinho e conforto mesmo quando distantes fisicamente.

Aos pacientes e voluntários desse estudo pela colaboração e pela confiança depositada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Roselino, uma grande pesquisadora e excelente Dermatologista, pela oportunidade oferecida, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, por me receber em seu Laboratório, por suas críticas e observações ao meu projeto.

Ao Dr. Diego Costa, pela imensurável ajuda em muitos passos desse projeto, por compartilhar seus conhecimentos, pelo grande auxílio nos experimentos e pela amizade.

À bióloga do Laboratório do Setor de Dermatologia do HC-FMRP-USP, Aline Turatti, pelo auxílio com os experimentos de histoquímica e de imunofluorescência direta, e à pós graduanda Aline Rafaela da Silva, pelos ensaios de ELISA.

À biomédica Neifi Deghaide, do Laboratório de Imunogenética do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela tipagem HLA.

Aos colegas pós-graduandos e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, em especial Fernanda Agostini, e do Laboratório do Setor de Dermatologia do HC-FMRP-USP, em especial Aline Lobo, bolsista TT3 FAPESP, por estarem sempre dispostos a nos receber e ajudar.

Aos médicos assistentes do Ambulatório de Dermatologia do HC-FMRP, pela grande contribuição na minha formação como dermatologista, por dividirem seus conhecimentos, e pelo apoio na seleção dos pacientes desse projeto.

Aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou, em especial Paula Rôla e Camilla Guimarães, que tornaram meus dias mais leves e estiveram tão presentes nessa etapa da minha vida.

Ao Liêvin, meu amor e companheiro, pelo incentivo durante toda essa caminhada.

À Profa. Dra. Silvia Bomfim Hyppolito, por ter despertado meu interesse na pesquisa científica ainda durante o curso de Medicina.

À FAPESP pelo apoio financeiro imprescindível a esse projeto de pesquisa. Essa tese constitui o subprojeto III do Projeto Temático FAPESP “Relação dos Fatores Imunogenéticos e Ambientais na Etiopatogênese dos Pênfigos em Amostragem Brasileira” (Processo de número 2010/51729-2).

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, o meu eterno e sincero agradecimento.

RESUMO

Albuquerque, CM. **Expressão dos Linfócitos CD4+CD25+ (Células T Reguladoras) nos Pênfigos**. 2014. 129f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introdução: Os pênfigos representam doenças bolhosas autoimunes, geneticamente determinados por alelos HLA–DQ e –DR de susceptibilidade. Caracterizam-se pela produção de autoanticorpos da classe IgG contra desmogleínas (Dsg) – proteínas da família das caderinas, responsáveis pela adesão entre os queratinócitos -, e consequente acantólise intraepidérmica. São classificados em duas formas principais: pênfigo vulgar (PV) que acomete pele e mucosas devido à produção de anticorpos contra Dsg3 e Dsg1, respectivamente, e pênfigo foliáceo (PF), que acomete exclusivamente a pele por apresentar autoanticorpos anti-Dsg1. Cinco a 10% das células CD4+ do sangue periférico expressam CD25, e, destas, de 1% a 2% expressam níveis aumentados de CD25. Estas células têm propriedades reguladoras e são chamadas células Treg CD4+CD25^{high}. Os linfócitos Treg naturais derivados do timo expressam constitutivamente, além do CD25, o gene Foxp3, e marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na caracterização dos mesmos, como CCR4 e CTLA4. As células T CD4+CD25^{high} (Treg) têm a função de inibir clones de linfócitos autorreativos, tendo papel importante na autotolerância imunológica e modulação das respostas imunes. Em relação aos pênfigos, descreve-se redução de cerca de dez vezes do número de células Treg em relação ao total de células CD4+ em pacientes com PV, bem como da expressão de Foxp3, mas não em pacientes com PF, quando comparados aos controles normais. *Objetivo:* Verificar a expressão das Treg no PV e no PF. *Material e Métodos:* Foram incluídos 15 pacientes (8 PF; 7 PV) sem tratamento imunossupressor por pelo menos 60 dias antecedendo a coleta de sangue periférico ou biópsia de pele. Amostras de sangue de 12 pacientes (6 PF; 6 PV) e de 12 controles, pareados por idade, sexo e cor, foram submetidos à quantificação e fenotipagem de Tregs por citometria de fluxo, e amostras de 10 pacientes (5 PF; 5 PV) e de 10 controles pareados, ao ensaio de proliferação celular e cocultivo para investigar as propriedades funcionais das Treg. A determinação de alelos HLA–DQ e –DR foi realizada em 13 pacientes (6 PF; 7 PV). Para estudos de imunohistoquímica (IHQ) e microscopia confocal, coletou-se biópsias de pele lesada de 6 pacientes (4 PF e 2 PV), e de região perilesional de 5 pacientes (3 PF, 2 PV). Empregaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, e de Friedman e Wilcoxon para a análise da quantificação das células imunomarcadas e da função das Tregs, respectivamente. Considerou-se significância estatística $\alpha=0,05$. *Resultados:* No grupo PV, a mediana da porcentagem das células Treg CD4+CD25^{high} foi de 1%; no grupo PF de 1,01%; e nos controles 1,57%, havendo diferença entre os três grupos ($p=0,009$), cuja comparação múltipla de Dunn resultou

significativa entre PF e controles ($p=0,05$), assim como entre PV e controles ($p=0,02$). Ao se agrupar pacientes com PF e PV, comparados aos controles, a porcentagem de Treg CD4+CD25^{high} foi menor no grupo dos pênfigos ($p=0,0013$), bem como de células T CD4+CD25^{high}Foxp3+ e de CD4+CD25^{high}CCR4+ entre os pacientes comparados aos controles ($p=0,001$ e $p=0,04$, respectivamente). Nos ensaios de proliferação celular, não houve diferença na capacidade de Treg de pacientes e controles em inibir a proliferação de PBMC em co-cultivo. O alelo HLA DRB1*01:02, o mais frequentemente relacionado à susceptibilidade ao PF na população brasileira, esteve frequente em 3/6 pacientes com PF desse estudo. Entre os pacientes com PV, o alelo DRB1*14:02 foi o mais frequente (o alelo 14 é descrito como de susceptibilidade em população brasileira), juntamente com o DQA1*03:01, descrito como alelo de susceptibilidade na população iraniana e de resistência ao PF na Tunísia (ambos observados em 3/7 pacientes). O HLA DQB1*03:02, associado à apoptose de Treg, confere susceptibilidade para PV e PF, e foi observado em 3 pacientes (1 PF e 2 PV) desse estudo. Dois desses pacientes tiveram Treg quantificadas no sangue periférico (2 PV), e dois, sua função analisada em ensaio de proliferação (1 PF ; 1 PV). Não foram observadas acentuação da redução de Treg no sangue periférico nem diferença na inibição de proliferação pelas mesmas. A análise microscópica da marcação imunohistoquímica para Foxp3 revelou a presença de infiltrado de células imunomarcadas, preferencialmente distribuídas na derme superior, observando-se infiltrado equivalente ao H&E. A distribuição de Foxp3+ foi semelhante nas 6 amostras (4 PF e 2 PV). Já as amostras de biópsia perilesional apresentaram imunomarcagem para Foxp3 escassa ou ausente, porém com infiltrado inflamatório observado ao H&E. A microscopia confocal demonstrou dupla marcação CD4+CD25+, confirmando a presença de Treg, já sugerida pela marcação Foxp3+ na histoquímica. *Conclusões:* As células CD4+CD25^{high} estão diminuídas no PF e no PV. Nos ensaios de proliferação celular, não houve diferença significativa na inibição de proliferação de PBMC pelas células CD25+ de pacientes e controles, sugerindo que a função das Treg esteja preservada nos pênfigos, apesar de reduzidas em número. O alelo HLA DQB1*03:02, presente em 3 pacientes (1 PF e 2 PV), relacionado à apoptose de Treg no diabetes mellitus, não esteve associado à acentuação da redução no número ou função das Treg. Células Foxp3+ encontram-se distribuídas preferencialmente na derme superior nas lesões de pênfigo, com imunomarcagem escassa ou ausente nas amostras perilesionais, não correspondendo ao infiltrado inflamatório evidenciado ao H&E. A redução numérica das células Treg no PV e PF pode estar envolvida na fisiopatologia da autoimunidade dessa doença bolhosa.

Unitermos: Células T regulatórias; Treg; pênfigo foliáceo; fogo selvagem; pênfigo vulgar; imunohistoquímica; microscopia confocal; citometria de fluxo; CCR4; CTLA4; Foxp3.

ABSTRACT

Albuquerque, CM. Expression of CD4 + CD25 + lymphocytes (Regulatory T Cells) in Pemphigus. 2014 129f. Thesis (Ph.D.) - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introduction: Pemphigus are autoimmune blistering diseases, genetically determined by susceptibility HLA-DR and -DQ. They are characterized by the production of IgG autoantibodies against desmoglein (Dsg) - proteins of the cadherin family, responsible for the adhesion of keratinocytes - and consequent intraepidermal acantholysis. They are classified into two main forms: pemphigus vulgaris (PV) which affects the skin and mucous membranes due to the production of antibodies against Dsg3 and Dsg1, respectively, and pemphigus foliaceus (PF), which exclusively affects the skin by presenting anti-Dsg1 autoantibodies. Five to 10% of CD4+ peripheral blood cells are CD25+, and of these 1% to 2% express increased levels of CD25. These cells have regulatory properties and are called CD4 + CD25^{high} Treg cells. Natural Treg lymphocytes derived from thymus constitutively express CD25, the Foxp3 gene, and surface markers which are not specific, but they assist in their characterization, like CCR4 and CTLA4. The CD4+CD25^{high} T (Treg) cells have the function of inhibiting lymphocyte autoreactive clones, having an important role in immunologic self-tolerance and modulation of immune responses. Regarding pemphigus, it is described an reduction of about ten times the number of Treg cells in the total CD4+ cell count and of the expression of Foxp3 in patients with PV, but not in patients with PF compared to normal controls. *Objectives:* To verify Treg cells expression in PV and PF. *Material and Methods:* 15 patients (8 PF ; 7 PV) were included in this study, all of them without immunosuppressive treatment for at least 60 days before the collection of peripheral blood or skin biopsy. Blood samples from 12 patients (6 PF ; 6 PV) and 12 controls matched by age, sex and race, were subjected to quantification and phenotyping of Tregs by flow cytometry, and samples from 10 patients (5 PF; 5 PV) and 10 matched controls, to the cell proliferation assay and co-culture to investigate the functional properties of Treg. The determination of HLA-DQ and -DR was performed in 13 patients (PF 6, 7 LW). For immunohistochemistry (IHC) studies of and confocal microscopy, it was collected skin biopsies from lesions of 6 patients (4 PV and 2 PF), and perilesional region of 5/6 patients (3 FP, 2 PV). We used the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney analysis for the quantification of immunostained cells, and Friedman and Wilcoxon, for the function of Tregs. We considered statistical significance $\alpha = 0.05$. *Results:* In the PV group, the median percentage of CD4+CD25^{high} Treg cells was 1%; the PF group of 1.01%; and 1.57% in controls, with significant differences among the three groups ($p = 0.009$), the multiple comparison Dunn was significant between PF and controls ($p = 0.05$), and between PV and

controls ($p = 0,02$). By grouping patients with PF and PV, compared to controls, the percentage of CD4+CD25^{high} Treg was lower in the pemphigus group ($p = 0.0013$) as well as CD4+T CD25^{high}Foxp3 + cells and CD4+ CD25^{high}CCR4+ among patients compared to controls ($p = 0.001$ and $p = 0.04$, respectively). In proliferation assays, there was no difference in the ability of Treg from patients and controls to inhibit proliferation of PBMC co-cultivated. The HLA DRB1*01:02, related to susceptibility to PF in the Brazilian population, was frequent in 3/6 patients with PF in this study. Among patients with PV, DRB1*14:02 was the most frequent allele (*14 gene as described as a susceptibility gene in Brazilian population) together with DQA1*03:01, described as a susceptibility allele in the Iranian population and as resistance to PF in Tunisia (both observed in 3/7 patients). The HLA DQB1*03:02, associated with the apoptosis of Treg confers susceptibility to PV and PF, and was observed in 3 patients (1 PF ; 2 PV) of the study. Two of these patients had Treg quantified in peripheral blood (2 PV), and two, their function analyzed in proliferation assay (1 PF ; 1 PV). Not greater reduction of Treg in the peripheral blood or differences in inhibition of proliferation was observed. Microscopic analysis of immunohistochemical staining for Foxp3 showed the presence of an infiltrate of immunostained cells distributed preferentially in the upper dermis, with equivalent infiltrate in H&E. The Foxp3+ distribution was similar in the 6 samples (4 PV ; 2 PF). However, the samples of perilesional biopsy showed sparse or absent immunostaining for Foxp3, but with inflammatory infiltrate observed by H&E staining. Confocal microscopy showed CD4+CD25+ double labeling, confirming the presence of Treg, as suggested by the labeling histochemistry Foxp3+. *Conclusion:* Treg CD4+CD25^{high} cells are reduced in PF and PV. In proliferation assays, there was no significant difference in the inhibition of PBMC proliferation by CD25+ cells from patients and controls, suggesting that the function of Treg is preserved in pemphigus, although reduced in number. The HLA DQB1*03:02, associated with apoptosis of Treg, confers susceptibility to PV and PF and was observed in 3 patients in this study, but with no associated reduction in the number or function of Treg among them. Foxp3+ cells are preferably distributed in the upper dermis in pemphigus lesions with little or no immunostaining in perilesional samples, although inflammatory infiltrate evidenced by H&E. The reduced number of Treg cells in PV and PF may be involved in the pathophysiology of this autoimmune bullous disease.

Key Words: Regulatory T cells; Treg; pemphigus foliaceus; Fogo Selvagem; pemphigus vulgaris; immunohistochemistry; Confocal microscopy; flow cytometry; CCR4; CTLA4; Foxp3.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração das formas clínicas de pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) 24
- Figura 2.** Células Treg CD4+CD25^{high} no sangue periférico de um controle saudável, paciente com PV e paciente com PF 62
- Figura 3.** Frequência de células T CD4+CD25+ no sangue periférico de pacientes com pênfigo vulgar (PV), pênfigo foliáceo (PF) e controles saudáveis em relação às PBMC 63
- Figura 4.** Frequência de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com pênfigo vulgar (PV), pênfigo foliáceo (PF) e controles saudáveis em relação às PBMC 64
- Figura 5.** Frequência de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com pênfigo e controles saudáveis em relação às PBMC 64
- Figura 6.** Frequência de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com pênfigo em relação às PBMC, estratificadas por idade 65
- Figura 7.** Quantificação de células CD4+CD25^{high}Foxp3+, CD4+CD25^{high}CCR4+ e CD4+CD25^{high}CTLA4+ no sangue periférico de pacientes com pênfigo e controles por citometria de fluxo 66
- Figura 8.** Correlação entre o número de Tregs no sangue periférico e os títulos de anti-Dsg, tempo sem tratamento imunossupressor e tempo de doença 67
- Figura 9.** Frequência de células CD4+CD25^{high} em relação às PBMC do sangue periférico de pacientes com pênfigos (excluídos aqueles que expressam o alelo HLA DQB1*03:02) e controles, comparados aos pacientes que expressam o alelo HLA DQB1*03:02 (2PF e 2PV)..... 69
- Figura 10.** Efeito inibitório na proliferação de PBMC estimulado por anti-CD3, na presença de células CD25+ de pacientes com PV e controles 71
- Figura 11.** Efeito inibitório das células CD4+CD25+ na proliferação de PBMC de pacientes com PV e controles (CO), mediante estímulo com anti-CD3 72
- Figura 12.** Marcação imunohistoquímica para Foxp3 em amostra de pele de pacientes com pênfigo vulgar (A,B) (paciente PV5), e com pênfigo foliáceo (C,D) (paciente PF8) 77
- Figura 13.** Microscopia confocal mostrando dupla marcação por imunofluorescência para CD4 (Alexa 488 – verde) e CD25 (Alexa 647- vermelho) em duas amostras de pele de pacientes com pênfigo foliáceo (pacientes PF6 e PF7) 78
- Figura 14.** Coloração com H&E (A), imunohistoquímica (B, D) e microscopia confocal (C) de amostra de biópsia de pele de paciente com diagnóstico de pênfigo foliáceo (PF 7) ... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alelos de suscetibilidade e resistência ao PV, PF e PFE, de acordo com a população estudada.....	30
Tabela 2. Casuística dos pacientes com Pênfigo e Controles – Grupo Citometria (G1).....	47
Tabela 3. Casuística de pacientes com Pênfigo e Controles – Grupo co-cultura (G2).....	47
Tabela 4. Dados demográficos dos pacientes com pênfigo foliáceo.....	48
Tabela 5. Dados demográficos dos pacientes com pênfigo vulgar.....	48
Tabela 6. Dados clínicos dos pacientes com pênfigo foliáceo.....	49
Tabela 7. Dados clínicos dos pacientes com pênfigo vulgar.....	50
Tabela 8. Distribuição dos pacientes com pênfigo foliáceo quanto à realização de Citometria de Fluxo, Ensaio de Proliferação Celular, Elisa anti-Dsg (desmogleína 1/3), HLA Classe II DQ e DR, e histoquímica.....	51
Tabela 9. Distribuição dos pacientes com pênfigo vulgar quanto à realização de Citometria de Fluxo, Ensaio de Proliferação Celular, Elisa anti-Dsg (desmogleína 1 e 3), HLA Classe II DQ e DR, e histoquímica.....	52
Tabela 10. Anticorpos utilizados na Citometria de Fluxo.....	54
Tabela 11. Anticorpos utilizados na Imunohistoquímica (IHQ).....	57
Tabela 12. Anticorpos utilizados na microscopia confocal.....	58
Tabela 13. Caracterização de HLA e quantificação de CD25 ^{high} no sangue periférico dos pacientes com pênfigo.....	70
Tabela 14. Resultados de quantificação de CD25 ^{high} no sangue periférico, Titulação anti-Dsg e Inibição de proliferação celular pelas Treg nos pacientes com pênfigo.....	74
Tabela 15. Descrição dos achados de infiltrado inflamatório ao H&E, marcação imunohistoquímica de Foxp3 nas lesões de pênfigo e amostras perilesionais.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Alofíco-cianina
AB	Avidina-Biotina
BP180	Antígeno 180 do penfigóide bulhoso
CCR	Receptor de quimiocina
CDD	Células dendríticas dérmicas
CL	Células de Langerhans
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CTLA	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>
Cyc	Ciclofosfamida
DCP	Pulsoterapia com dexametasona associada à ciclofosfamida
DM	Diabetes mellitus
Dsg	Autoanticorpos antidesmogleína
EC	Ectodomínio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Fogo Selvagem
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA	<i>Human Leucocyte antigen</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (anticorpo monoclonal)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Mililitros

mM	Milimolar
MTF	Metformina
MTX	Metotrexate
Neg	Negativo
NK	Células <i>natural killer</i>
PBS	Salina fosfatada tamponada
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PE	Ficoeritrina
PECy	Ficoeritrina cianina
PF	Pênfigo foliáceo
PV	Pênfigo vulgar
RPM	Rotações por minuto
TA	Temperatura ambiente
TCR	Receptor de células T
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	Células T <i>helper</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Receptor de Fator de necrose tumoral)
Tr	Células Treg induzidas
Treg	Células T regulatórias
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
g	Aceleração da gravidade
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Revisão da Literatura.....	21
1. Epidemiologia dos Pênfigos	22
2. Etiopatogenia dos Pênfigos	25
3. Mecanismos de Acantólise	27
4. HLA e Pênfigos	29
5. Imunologia da Pele	31
6. Imunologia dos Pênfigos	32
7. Células T Regulatórias	34
8. Pênfigos e Treg.....	40
3. Objetivos.....	43
4. Métodos	45
1. Casuística.....	46
2. Técnica de ELISA para Anti-Dsg.....	52
3. Técnica de PCR para determinação de HLA.....	52
4. Obtenção de PBMC para Citometria de Fluxo e Ensaio de Proliferação Celular	53
5. Caracterização Fenotípica das PBMC e Análise de Treg por Citometria de Fluxo	53
6. Separação das subpopulações de Células T e co-cultura.....	54
7. Preparo das Amostras de Pele e Obtenção dos Cortes	56
8. Coloração Histológica convencional Hematoxilina-Eosina.....	56
9. Técnica de Imunohistoquímica.....	56
10. Técnica de Microscopia Confocal	58
11. Análise Estatística – Citometria e Cultura.....	59
12. Análise Estatística – Comparação de variáveis	59
13. Análise descritiva – IHQ e Microscopia Confocal.....	60
5. Resultados	61
1. Dosagem de Anticorpos Anti-desmogleína	62
2. Citometria de fluxo	62

3. Caracterização dos alelos HLA	68
4. Ensaio de co-cultura.....	70
5. Hematoxilina-eosina (H&E).....	75
6. Imunohistoquímica	75
7. Microscopia Confocal.....	78
6. Discussão	80
7. Conclusões	87
8. Referências Bibliográficas	89
9. Anexos.....	105
10. Artigo	109

1. Introdução

Os pênfigos caracterizam-se pela presença de autoanticorpos da classe IgG contra desmogleínas, proteínas da família das caderinas, responsáveis pela adesão entre os queratinócitos. Enquanto o pênfigo vulgar (PV) afeta pele e mucosas pela produção de autoanticorpos contra desmogleína (Dsg) 1 e Dsg3, respectivamente, o pênfigo foliáceo (PF) acomete exclusivamente a pele, apresentando somente anticorpos anti-Dsg1. Clinicamente, o PV caracteriza-se por bolhas flácidas, devido ao nível de clivagem na região suprabasal da epiderme, sendo que, em mais de 50% dos casos, a manifestação inicial é oral, podendo preceder as lesões cutâneas em vários meses, ou ser a única manifestação da doença. Já o PF apresenta bolhas superficiais, que se rompem facilmente, deixando áreas erodadas e descamativas. Com a evolução, as lesões do PF tornam-se crostosas, com base eritematosa. Ambas as formas de pênfigo são endêmicas na região nordeste do estado de São Paulo (Abréu-Velez et al., 2010a; Gonçalves et al., 2011; Ruocco et al., 2013).

As células T regulatórias (Treg) foram descritas por Sakaguchi et al. em 1995, sendo caracterizadas como células T derivadas do timo que expressavam constitutivamente CD25 (cadeia alfa do receptor de interleucina 2 - IL-2), chamadas CD4⁺CD25⁺, capazes de regular a resposta imune aos antígenos próprios e não próprios. Desde então, as células Treg têm sido objeto de estudos em diversos modelos de doenças autoimunes, sendo consideradas como forma promissora de imunoterapia. Deficiência ou alteração na função das Treg podem levar à autoimunidade, ou agravar processos inflamatórios induzidos por patógenos. Costa et al. (2013) observaram função preservada de Treg em pacientes com leishmaniose cutânea, porém, ativação exacerbada das Treg poderia interferir na eliminação do parasito e contribuir para a cronicidade da infecção (Costa et al., 2013; Sakaguchi et al., 1995).

Demonstrou-se que células Treg induzidas (Tr) tipo 1, produtoras de IL-10 reativas à Dsg3, foram identificadas em 5 de 6 doadores saudáveis carreadores dos alelos HLA de classe II DRB1*04:02 e DQB1*05:03 (associados ao PV), e em apenas 2 de 12 pacientes com PV.

Esses achados sugerem que células Treg tipo1 (Tr1) podem estar envolvidas na manutenção da tolerância periférica dos doadores saudáveis, e poderiam contribuir na restauração da tolerância imunológica nos pacientes com PV (Yokoyama et al., 2010). Sugiyama et al. (2007) evidenciaram redução de cerca de dez vezes do número de células Treg em relação ao total de células CD4+ em pacientes com PV, bem como da expressão de Foxp3. Porém, esse achado não se confirmou em pacientes com PF, quando comparados aos controles (Sugiyama et al., 2007).

Na ocasião do desenvolvimento desse projeto, havia um estudo associando Treg ao PV. Ainda hoje há apenas 4 estudos publicados com esse tema, sem relatos até o momento de avaliação da função das Treg nos pênfigos.

Assim, esse estudo teve por objetivo geral avaliar o papel das células Treg como mecanismo da perda da autotolerância nos pênfigos.

2. Revisão da Literatura

O termo pênfigo origina-se do grego – derivado de “pemphix” que significa bolha – e descreve um grupo de doenças bolhosas autoimunes envolvendo pele e mucosas. Tem como característica histológica a formação de bolha acantolítica intraepidérmica, e o depósito de autoanticorpos da classe IgG na superfície dos queratinócitos, visualizados à imunofluorescência direta (IFD). Os pênfigos são divididos em dois grupos principais: pênfigo vulgar (PV), no qual a acantólise (perda da adesão celular) ocorre no estrato espinhoso suprabasal, podendo acometer pele e/ou mucosas; e o pênfigo foliáceo (PF), com acantólise na camada granulosa subcórnea, que acomete somente a pele (Femiano, 2007; Stanley; Kiaus-Kovtun; Sampaio, 1986).

De acordo com Lever (1965), MacBride descreveu os primeiros cinco casos de PV em 1777, e posteriormente, Cazenave identificou o PF, em 1844. Em 1943, Civatte descreveu a acantólise nos pênfigos, diferenciando-o de dermatoses com formação de bolha subepidérmica, tais como penfigóide bolhoso ou dermatite herpetiforme (Civatte, 1943; Lever, 1965).

Pyotr Vasilyewich Nikolsky descreveu o sinal que ganhou seu nome em 1896. A pressão exercida na pele aparentemente sã de pacientes com pênfigo resulta em descolamento epidérmico, e indica atividade da doença. O sinal de Nikolsky é positivo nos pênfigos, podendo estar presente também em outras doenças bolhosas, como na necrólise epidérmica tóxica, na síndrome da pele escaldada estafilocócica, no enxerto versus hospedeiro e na epidermólise bolhosa (Salopek, 1997).

1. Epidemiologia dos Pênfigos

O PV apresenta distribuição mundial, ocorre de forma semelhante em ambos os sexos, tem pico de incidência entre a quarta e sexta décadas de vida, e pode acometer qualquer faixa etária. A incidência mundial do PV aproxima-se de 0,1 a 0,7 casos por 100.000 habitantes.

Clinicamente, observam-se bolhas flácidas, que surgem na pele normal ou eritematosa, que se rompem facilmente, formando erosões dolorosas, que sangram com facilidade. As bolhas podem ser localizadas ou generalizadas (Figura 1), podendo acometer qualquer área da pele e mucosas recobertas por epitélio escamoso estratificado (Chams-Davatchi et al., 2005; Langan et al., 2008; Stanley, 2003).

A incidência do PV vem aumentando nos últimos anos em diversos países, e a distribuição do PV e PF depende muito da população estudada. Nos Estados Unidos, a proporção entre PV e PF é de 5:1 (Femiano, 2007; Sagi et al., 2008). Entre 2001 e 2005, o Reino Unido registrou em média 467 novos casos de PV por ano, com estimativa de aumento de 11% ao ano, e taxa de mortalidade três vezes maior que a população geral (Langan et al., 2008).

A descrição de PV em crianças e adolescentes é rara. Chanussot-Deprez et al., 2007, apresentaram um caso de PV em paciente de 14 anos, fazendo cuidadosa revisão da literatura quanto à ocorrência de PV em crianças e quanto ao tratamento. No Brasil, relatou-se também o aumento da incidência do PV, principalmente entre a população jovem, em áreas endêmicas de PF (Chanussot-Deprez et al., 2007; Rocha-Alvarez et al., 2007).

Em relação à sua epidemiologia, o PF cursa com duas formas de apresentação: uma esporádica, descrita por Cazenave em 1844 e assim conhecido como pênfigo de Cazenave, com distribuição mundial, e a forma endêmica, o pênfigo foliáceo endêmico (PFE), também conhecido como Fogo Selvagem (FS). Clinicamente, o PF evolui sob duas formas principais: localizada e generalizada. Na forma localizada, mais comum, as lesões limitam-se às áreas seboreicas – face, cabeça, pescoço e região superior do tronco, porém a doença pode disseminar-se, com acometimento extenso do tronco, abdome, membros superiores e inferiores – forma generalizada, Figura 1 (Sampaio SAP; Rivitti, EA, 2007).



Figura 1. Ilustração das formas clínicas de pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV). **A e B:** Paciente apresentando a forma disseminada do PF, com lesões erosivas e descamantes. **C:** Paciente apresentando a forma localizada de PV, com acometimento do dorso do nariz e da mucosa oral. **D:** Paciente apresentando a forma disseminada do PV, com lesões erosivas e crostosas disseminadas e acometimento da mucosa oral (Fonte: Arquivo do Ambulatório de Doenças Autoimunes, Divisão de Dermatologia – FMRP USP).

As formas de apresentação do PF diferenciam-se principalmente pela sua epidemiologia. O FS é endêmico em áreas rurais do Brasil, especialmente próximas a rios, habitat de insetos *Simulium nigrimanum*, e acomete crianças e adultos da mesma família, ao contrário da forma esporádica do PF. Mais de 15.000 casos foram diagnosticados no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Também têm sido descritos casos de PF na Colômbia, Peru e Tunísia (Abréu-Vèlez et al., 2010a; Chiossi; Roselino, 2001; Gonçalves et al., 2010).

O primeiro registro de FS no Brasil foi feito por Paes Leme em 1903. Em 1912 foram comunicados novos casos oriundos de Minas Gerais e da região nordeste do estado de São Paulo. Desde a década de 30, houve aumento significativo do número de casos nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Os municípios de Franca e Ribeirão Preto, na região nordeste do

estado de São Paulo, são ainda endêmicos para o FS (Abréu-Vélez et al., 2010a; Chiossi; Roselino, 2001; Gonçalves et al., 2010).

Análise de série histórica de 21 anos, referente aos casos de pênfigos acompanhados no Ambulatório de Dermatoses Autoimunes do HC-FMRP-USP, o qual atende pacientes referenciados de diversas regiões do país – principalmente da região nordeste do estado de São Paulo – confirmou aumento da incidência do PV, ultrapassando aquela do PF a partir de 1998 (Gonçalves et al., 2010).

2. Etiopatogenia dos Pênfigos

O PV e o PF são classicamente definidos como doenças caracterizadas por acantólise, com formação de bolhas intraepidérmicas, cursando com a presença de autoanticorpos patogênicos da classe IgG, principalmente IgG4, contra desmogleínas – glicoproteínas transmembrana dos queratinócitos, localizadas nos desmossomos, responsáveis pela adesão entre os queratinócitos (Diaz et al., 1989; Rock et al., 1989; Stanley; Kiaus-Kovtun; Sampaio, 1986). No pênfigo em atividade, a imunofluorescência direta (IFD) é positiva na superfície dos queratinócitos da pele lesada e perilesional, correspondendo a depósitos de IgG contra Dsg. Dependendo do substrato, a imunofluorescência indireta (IFI) é positiva para IgG em 80% dos casos (Stanley, 2003).

As propriedades patogênicas dos autoanticorpos contra Dsg podem ser demonstradas através da transferência de IgG purificada do soro de pacientes com pênfigo quando injetada no peritônio de camundongos BALB/c recém-nascidos. Em poucas horas há reprodução da histologia, imunohistologia e clínica do pênfigo, e há correlação entre os títulos de IgG circulantes no soro dos camundongos e a extensão da doença induzida (Anhalt; Labib; Voorhees, 1982; Roscoe et al., 1985).

No PV, os autoanticorpos direcionam-se contra a Dsg3, de 130 kDa, enquanto no PF o alvo é a Dsg1, de 160 kDa. Pacientes com PV que apresentam lesões mucosas e cutâneas possuem anticorpos anti-Dsg3 e anti-Dsg1, enquanto aqueles que possuem somente IgG anti-Dsg3 têm acometimento apenas da mucosa. Isto ocorre devido à maior concentração de Dsg1 em relação à Dsg3 no estrato epidérmico da pele, e o contrário ocorre na camada espinhosa das membranas mucosas. Devido a este mecanismo de compensação, não há formação de bolhas nas membranas mucosas de pacientes com PF, já que eles apresentam somente IgG anti-Dsg1 (Stanley, 2003; Tron et al., 2005; Waschke, 2008).

Vargas et al. (2006), do Grupo Cooperativo de Pesquisa em Fogo Selvagem, demonstraram que anticorpos anti-Dsg1, em indivíduos saudáveis e naqueles com FS em remissão, reconhecem epítomos EC5 da Dsg1. Esses autores relataram que a conversão sorológica do fenótipo saudável para o doente é caracterizada pela modificação do perfil de imunoglobulinas: de IgG1 com epítipo alvo EC5 da Dsg1 na fase pré-clínica, para o predomínio de IgG4 contra os domínios EC1 e 2 na doença (fenômeno de *epitope spreading*). Esses dados, aliados ao aumento progressivo dos níveis de anticorpos anti-Dsg1, de acordo com a proximidade do foco endêmico de FS, sustentam a hipótese da associação de um agente ambiental na etiopatogênese da doença (Diaz et al., 2008; Vargas et al., 2006; Warren et al., 2000). Considera-se ainda que autoanticorpos contra outras caderinas desmossômicas ou reação cruzada das mesmas possam também estar envolvidas na patogênese dos pênfigos (Flores et al., 2012; Grando, 2012).

Os pênfigos têm sido extensivamente estudados em nível molecular, em especial suas características imunológicas e genéticas, porém a etiopatogênese ainda não foi completamente elucidada. O papel dos fatores ambientais é crucial no estudo dos pênfigos, pois a forma endêmica do PF em algumas regiões como Norte da África, Turquia e América do Sul ainda é cercada de mistérios, suscitando vasto campo para pesquisa (Abréu-Vélez et al., 2010b).

O PF vem sendo relacionado à picada de insetos hematófagos, em especial *Simulium nigrimanum*, desde a década de 1940 (Vieira, 1942). Em relação ao papel das proteínas salivares de insetos hematófagos na etiopatogênese do PF, descreveu-se a presença de anticorpos da classe IgG contra proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, com destaque à proteína maxadilán (Diaz et al., 2008; Roselino et al., 2001). Mais recentemente, constatou-se a reatividade do soro de pacientes com PF também contra proteínas de *Simulium nigrimanum* e de *Aedes aegypti*, e imunorreatividade antigênica cruzada entre as proteínas dos três insetos acima mencionados (Kim et al., 2008; Kim, 2012).

3. Mecanismos de Acantólise

O mecanismo fisiopatológico da acantólise nos pênfegos ainda não está completamente esclarecido. A observação de que autoanticorpos IgG nos pênfegos eram dirigidos às Dsg 1 e 3 levou à hipótese de que a ligação dos anticorpos a porções específicas da Dsg comprometeria as interações do tipo *trans* entre os desmossomos intercelulares, e o processo de acantólise seria decorrente da alteração espacial estérica (*steric hindrance*). Outras hipóteses, no entanto, vêm sendo levantadas, como a indução de vias de sinalização mediada pelos anticorpos, que levaria à perda da adesão celular e à apoptose (Stanley e Amagai, 2006).

Seishima et al. (1995) foram os primeiros a descrever a ativação de vias de sinalização em células expostas aos autoanticorpos anti-Dsg, quando observaram o aumento nos níveis intracelulares de cálcio nos queratinócitos expostos ao soro de pacientes com PV. Em estudos subsequentes, demonstrou-se a ativação de outras moléculas de sinalização, incluindo proteína quinase C e fosfolipase C (Osada; Seishima; Kitajima, 1997; Seishima et al., 1995). Novas vias de sinalização vêm sendo descritas, que podem contribuir para a perda da adesão entre os queratinócitos, ou ser induzidas pela perda da adesão mediada por anticorpos

(Aoyama; Owada; Kitajima, 1999; Caldelari et al., 2001; Chernyavsky et al., 2007; Delva et al., 2008; Waschke et al., 2006).

Um terceiro mecanismo sugerido para a indução da acantólise é a via da apoptose. Há relatos de apoptose em queratinócitos expostos ao soro de pacientes com pênfigo ou à IgG anti-Dsg purificada, observada em culturas de tecido *in vitro*, modelos de pênfigo em camundongos, ou ainda em biópsias de pele humanas (Wang et al., 2004; Wolf et al., 2005). No entanto, embora haja evidências de apoptose nos pênfigos, permanece o questionamento de que seja a causa, resultado ou ainda um subproduto da acantólise. Dados atuais sugerem que a apoptose não é necessária para a formação de bolhas nos pênfigos, porém, a ativação de proteínas proapoptóticas, incluindo as caspases, pode sensibilizar os queratinócitos à acantólise mediada pelos anticorpos IgG anti-Dsg (Grando, 2012).

Observou-se aumento do FasL no soro e em biópsias de pele de pacientes com PV, sugerindo que a apoptose seria desencadeada pela via Fas/FasL (Pacheco-Tovar et al., 2009; Puviani et al., 2003; Sayama et al., 1994; Wang et al., 2004; Wolf et al., 2005). Zucolotto et al. (2003) demonstraram a expressão da apoptose em biópsias perilesionais de pacientes com PF. Relata-se ainda a presença de apoptose em biópsias de pele de FS, associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IFN gama e IL-1, sugerindo que mediadores inflamatórios podem contribuir para a indução de apoptose no FS (Rodrigues et al., 2009; Zucolotto et al., 2003).

Li et al. (2009) analisaram a habilidade de inibidores das caspases de bloquear a acantólise *in vivo* usando modelos de PF em camundongos. Observaram que o pré-tratamento com inibidores de caspases Ac-DEVD-mck ou Boc-D-fmk em camundongos neonatos preveniu a formação de bolhas nesses animais (Li et al., 2009).

A ativação da quinase p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) tem sido estudada como parte do mecanismo precoce pelo qual os anticorpos anti-Dsg induzem a perda

da adesão celular em PV e PF. Observou-se fosforilação da *Heat Shock Protein* (HSP) 27 e da p38MAPK em biópsias de pele de modelos em camundongos de PV e PF, e a formação de bolhas foi inibida nesses animais quando tratados com inibidores da p38MPAK (Berkowitz et al., 2006; Berkowitz et al., 2008; Kawasaki et al., 2006). Estudos posteriores mostraram que autoanticorpos IgG anti-Dsg 3 de pacientes com PV induziram a internalização celular da Dsg3 em endossomos. Essa internalização e subsequente degradação da Dsg3 foram bloqueadas quando utilizados inibidores da p38MAPK, destacando sua importância na regulação da patogenicidade dos autoanticorpos anti-Dsg no PV (Jolly et al., 2010).

4. HLA e Pênfigos

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) representa o conjunto de genes responsáveis por codificar as moléculas de histocompatibilidade em uma determinada espécie, sendo chamado no ser humano de sistema HLA. Em humanos, esses genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6 e reunidos em 3 grupos, denominados genes de classe I, classe II e classe III. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA- A, B e C, os genes de classe II codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA- DP, -DQ e -DR, e os genes de classe III, embora estejam incluídos dentro do MHC, não codificam moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, algumas delas fazendo parte do sistema imune, outras não. As moléculas da Classe I estão presentes na maioria das células somáticas, e as de Classe II ocorrem predominantemente em linfócitos T ativados e linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células do timo, codificando as moléculas HLA- DM, DO, DP, DQ e DR (Klein e Sato, 2000).

A associação do PF e PV com alelos HLA classe II vem sendo demonstrada por genotipagem e sequenciamento, em diferentes etnias. Resumidamente, os estudos indicando HLA de susceptibilidade e de resistência estão elencados na Tabela 1.

Tabela 1. Alelos de suscetibilidade e resistência ao PV, PF e PFE, de acordo com a população estudada

Alelos HLA	DRB1	DQA1	DQB1	População	Referência
Suscetibilidade					
PV	*1404	*0101	*0503	Indiana	Lombardi et al., 1996
	*1404	*0101	*0503	Paquistanesa	Delgado et al., 1997
	*0403, 0406, 1401, 1405, 1406	*0301	*0503	Japonesa	Miyagawa et al., 1997
	*0402, *1401, *1404	*0104, *0301	*0503, *0302	Judeus não Ashkenazi (NA)	Loiseau et al., 2000
	*0402, *1401, *1404	*03, *0505	*0302	Franceses	Loiseau et al., 2000
	*0404, 1401		*0503, 0302	Argentinos	Glorio et al., 2002
	*0404, 1401		*0301, 0104	Iranianos	Shams et al., 2009
	*0402, *1454, *0701		*0302, *0503	Branços europeus, asiáticos	Saha et al., 2010
	*0804, *0402, *14			Brasileiros	Weber et al., 2011
Resistência					
PV	*07, *03		*02	Franceses	Loiseau et al., 2000
Suscetibilidade					
PF	*0404, *0102		*0302	Franceses	Loiseau et al., 2000
	*04, *1404		*0503	Italianos	Lombardi et al., 1999
	*03			Tunisianos	Abida et al., 2009
PFE	*0101, *0102, *0103, *0404, *0406, *0410, *1406, *1601			Brasileiros	Pavoni et al., 2003
	*0102, *0404, *1402, *1406			Brasileiros	Culton et al., 2008

Alelos HLA	DRB1	DQA1	DQB1	População	Referência
Resistência					
PF	*11,*13,*06			Tunisianos	Abida et al., 2009
PFE	*03,*0301, *0701, *0801, *1101, *1104, *1402			Brasileiros	Pavoni et al., 2003
	*11, *13		*0301	Tunisianos	Cerna et al., 1993

Moléculas HLA classe II são essenciais no desenvolvimento de respostas imunes mediadas por células T ou anticorpos, através da apresentação de peptídeos antigênicos às células T. Nos pênfigos, a ativação de linfócitos B e produção de autoanticorpos dependem da interação entre os receptores das células T e moléculas HLA classe II, sendo abolida a produção de anticorpos anti-Dsg 3 *in vitro* quando as células T CD4 são depletadas (Nishifuji et al., 2000).

Certos genótipos HLA-DRB1 apresentam forte influência no risco de desenvolvimento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, esclerodermia, esclerose múltipla, diabetes, tireoidite autoimune, entre outras (Arnett et al., 2010; Hemminki et al., 2009; Simmons; Gough, 2004; Weyand et al., 1992).

Glisic et al. (2009) observaram associação dos alelos HLA- DQB1 *0302, *0201 e *0602 com apoptose de células T regulatórias em pacientes com diabetes tipo I. O alelo HLA-DQB1*0302 confere susceptibilidade para PV e PF (Loiseau et al., 2000; Saha et al., 2010; Pavoni et al., 2003).

5. Imunologia da Pele

Linfócitos T residem na pele normal, com função de vigilância imunológica, sendo também capazes de promover processos inflamatórios e resposta imune, independente de

recrutamento de células T do sangue periférico (Kupper, 2012a, Kupper, 2012b). Há cerca de 20 bilhões de células T residentes na pele humana, quase o dobro do observado no sangue periférico, com a responsabilidade de defender o organismo contra tumores e patógenos, além de manter a autotolerância aos antígenos próprios, expostos durante processos de injúria (Clark, 2010).

Células T CD4⁺ podem diferenciar-se em Th1, Th2 e Th17 dependendo das citocinas do meio. Na presença de IL-12, diferenciam-se em células Th1 produtoras de IFN-gama, e na presença de IL-4, diferenciam-se em células Th2 produtoras de IL-4, IL-5 e IL-13. Células Th17 produzem IL-17 e IL-22. A diferenciação de células Th17 necessita da presença de TGF-beta e IL-6, enquanto IL-23 e IL-21 são essenciais para a sua expansão. Em indivíduos saudáveis, aproximadamente 1% das células T CD4⁺ no sangue periférico são células Th17, e pequeno aumento é observado em pacientes com câncer ou doenças autoimunes. No entanto, juntamente com as células IL17⁺CD8⁺ (Tc17), as células Th17 aumentam dramaticamente em número em microambientes patológicos, quando secretam conjuntamente altos níveis de IL-17 (Kryczek, 2007; Kryczek, 2009).

À luz do conhecimento atual, o mecanismo de autotolerância na pele envolve a indução/ativação de Treg pelas células de Langerhans (CL) e células dendríticas dérmicas (CDd). As CL promovem a proliferação de células Treg residentes na presença de antígenos autólogos, enquanto na presença de patógenos, induzem proliferação de células T efectoras de memória. Já as CDd atuam apresentando antígenos epidérmicos nos linfonodos, estimulando a conversão de células T CD4 *naive* em Treg (Seneschal et al., 2012).

6. Imunologia dos Pênfigos

Classicamente, os pênfigos são considerados doenças mediadas por linfócitos B e pela produção de autoanticorpos, porém tem-se estudado a associação de outras células do sistema

imune na patogênese dos pênfigos. Em estudo realizado com 16 pacientes com FS, dez deles apresentando a forma localizada da doença, e 6 pacientes, a forma disseminada, observou-se que leucocitose foi mais frequentemente observada no grupo de doença disseminada; todos os pacientes apresentaram redução relativa no número de células CD3+ e CD4+, e tendência à redução de células CD8+. Observaram, ainda, associação direta entre os títulos de anticorpos no soro (por imunofluorescência indireta) e a disseminação das lesões (Barraviera et al., 1995).

Demonstrou-se através de estudo *in vitro* que linfócitos T purificados de pacientes com FS proliferam mediante exposição à Dsg1, de forma dose-dependente, indicando que essas células reconhecem antígenos da Dsg1. A resposta foi específica, não havendo proliferação dos linfócitos T quando incubados com o antígeno epidérmico BP180 (antígeno 180 do penfigóide bolhoso). Os controles, formados por pacientes com penfigóide bolhoso, lúpus sistêmico e psoríase, não apresentaram resposta proliferativa mediante o mesmo estímulo (Lin et al., 2000).

Chiossi; Costa; Roselino (2004) analisaram biópsias de lesões de 22 pacientes com PF (dos quais em 13/22 também foram adquiridas biópsias perilesionais), comparadas a biópsias de pele de controles saudáveis, e observaram que nos 13 pacientes com biópsia de lesão e perilesional, a quantidade de células de Langerhans e células dendríticas era maior na lesão. Além disso, houve correlação direta entre o número de células dendríticas nas biópsias de pacientes com pênfigo e os títulos de autoanticorpos anti-Dsg por IFI, a qual não foi observada para as células de Langerhans. Curiosamente, Corell et al. (2010) demonstraram que, após imunoterapia com células dendríticas, houve redução de Treg no sangue periférico em pacientes com melanoma (Chiossi; Costa; Roselino, 2004; Corell et al., 2010).

Em 19 pacientes com pênfigo sem tratamento, sendo 7 de PV e 12 de PF, descreveu-se aumento na produção basal de IL-6 e TNF-alfa (*Transforming growth factor* alfa) no sobrenadante de cultura de monócitos periféricos, quando comparados a controles. Observou-

se ainda aumento em número e redução na afinidade pelo receptor de glicocorticoides nesses pacientes, sugerindo resistência aos glicocorticoides em pacientes com pênfigo. O padrão de citocinas próinflamatórias poderia estar associado aos mecanismos de resistência ou susceptibilidade ao tratamento com glicocorticoides (Chriguer; Roselino; Castro, 2012). Ainda, terapias alvo anti-TNF em pacientes com PV demonstraram resultados controversos (Fiorentino et al., 2010; Garcia-Rabasco et al., 2012; Shetty et al., 2009).

Outro estudo, com 25 pacientes com PF e 10 controles saudáveis, mostrou no soro dos pacientes com PF menor concentração de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN-gama. Já IL-10 e IL-12 estavam aumentadas, quando comparadas aos controles. Não houve associação entre os níveis de citocinas e as formas (localizada ou disseminada) de PF. Os autores concluíram que, considerando o paradigma Th1/Th2, no PF predomina o padrão de resposta Th2 (Zeoti et al., 2000).

As células Th17 e Tc17 estão aumentadas em biópsias de pele de lesões de psoríase e estão associadas à retocolite ulcerativa, doença de Crohn e artrite reumatoide (Zaba et al., 2009; Yen et al., 2006; Leipe et al., 2010). Em estudos com biópsias de lesão de pele de 11 pacientes com PV e 7 pacientes com PF, observou-se aumento da razão de células IL-17+/CD4+ em pacientes com PV, em relação ao PF. Não houve correlação entre as células Th17 e a gravidade da doença ou níveis de anticorpos circulantes (Arakawa et al., 2009). Estudo subsequente observou que a razão IL-17+/CD4+ também está aumentada em biópsias de pele de pacientes com penfigóide bolhoso, quando comparadas às de PF (Arakawa et al., 2011).

7. Células T Regulatórias

O sistema imune tem a função de proteger o organismo contra diversos agentes patogênicos, tendo desenvolvido amplo repertório de reconhecimento antigênico. Nesse processo há, no entanto, potencial para gerar linfócitos capazes de reconhecer autoantígenos,

sendo necessário um mecanismo de supressão para controle das respostas imunes potencialmente patogênicas (Jiang; Chess, 2006).

A destruição dos linfócitos autorreativos no timo representa o mecanismo primário que leva à tolerância imunológica, quando células autorreativas que reconhecem antígenos próprios com alta afinidade são eliminadas por seleção clonal. Sabe-se, porém, que o mecanismo de deleção clonal pode não ser suficiente para controlar as células T autorreativas, principalmente quando estas reagem com autoantígenos expressos fora do timo. Assim, mecanismos de tolerância periférica atuam promovendo anergia e modulação das células maduras (Jiang; Chess, 2006, Kappler; Roehm; Marrack 1987; Sakagushi et al., 1995).

A geração de células T reguladoras (Treg) foi proposta para explicar o mecanismo de autotolerância atribuído ao timo. Em 1995, Sakaguchi et al. descreveram pela primeira vez que células T derivadas do timo expressavam constitutivamente CD25 (cadeia alfa do receptor de IL-2), chamadas CD4⁺CD25⁺, capazes de regular a resposta imune a antígenos próprios e não próprios. A eliminação ou a redução dessas células cursou com respostas imunes exacerbadas, bem como com desenvolvimento de doenças autoimunes em camundongos, sendo que a reconstituição dessa população celular inibiu a autoimunidade nos animais (Sakagushi et al., 1995; Asano et al., 1996). Desde então, as células CD4⁺CD25⁺ e sua função na manutenção da autotolerância e modulação das respostas imunes vêm sendo objetos de intensos estudos, analisando seu papel em doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes e na imunologia dos transplantes. Deficiência ou alteração na função das Treg pode levar à autoimunidade, ou agravar processos inflamatórios induzidos por patógenos (Sakagushi et al., 2008; Costa et al., 2013).

As células Treg surgem primariamente no timo e são encontradas no sangue periférico e nos órgãos linfoides secundários. As células Treg naturais expressam constitutivamente

CD4 e CD25, no entanto, outras células T CD4⁺CD25⁻ podem, uma vez ativadas, expressar transitoriamente a molécula CD25 (Sakaguchi et al., 1995; Sakaguchi et al., 2004).

Na análise por citometria de fluxo, as células T CD4⁺ podem ser divididas em três populações: CD25^{high}, CD25^{low} e CD25^{neg}, sendo que a população CD25^{high} opera como reguladora (Baecher-Allan et al, 2001; Wing e Sakaguchi, 2012).

Além do marcador CD25, as Tregs naturais expressam ainda marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na identificação das mesmas, entre os quais podemos citar: CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*) (Verhagen et al., 2013; Tsakiri et al., 2012; Baecher-Allan et al., 2001). O receptor de quimiocina CC 4 (CCR4) é expresso por células Treg e células Th2, sendo essas células T diferenciadas pela expressão do CD25: subpopulações CCR4⁺CD25^{high} são observadas nas Treg, e CCR4⁺CD25^{low} presentes nas células Th2 (Iellem et al., 2001).

A expressão de HLA-DR em aproximadamente 1/3 das células Treg confere heterogeneidade marcante entre as Treg em humanos (Baecher-Allen et al., 2001). Células Tregs HLA-DR⁺, com expressão de altos níveis de mRNA Foxp3, inibem diretamente a proliferação celular e a produção de citocinas, através contato célula-célula. As células Tregs HLA-DR⁻, ou seja, que não expressam DR, representam uma subpopulação distinta de Treg, que apresentam produção precoce de IL-4 e IL-10, e mais tardiamente supressão através do contato célula-célula e indução de Foxp3 (Baecher-Allen et al., 2006; Baecher-Allen; Hafler, 2006).

Hori, Nomura e Sakaguchi (2003) observaram que doenças semelhantes manifestavam-se mediante manipulação de Tregs e defeitos no gene Foxp3 (*forkhead box p3*). Demonstraram que esse fator de transcrição é expresso predominantemente em Tregs, sendo crucial para o desenvolvimento e função dessas células, e consiste em um marcador mais específico que os até

então descritos (CD25, CTLA4, GITR) (Hori; Nomura; Sakaguchi, 2003). Observou-se, através de *Real time PCR (polymerase chain reaction)* qualitativa, aumento na expressão do gene Foxp3 em células T CD4+CD25+. Os autores identificaram ainda que, em camundongos Foxp3⁻, as células CD4+CD25+ isoladas dos linfonodos não apresentaram função supressora (Fontenot; Garvin; Rudensky, 2003). Assim, tem-se demonstrado grande importância do Foxp3 no desenvolvimento e função das Treg tanto em camundongos quanto em humanos, sendo requerido para o desenvolvimento de Treg CD25^{high} (Sakaguchi, 2004).

Pacientes com mutação no gene Foxp3 apresentam a síndrome denominada IPEX, síndrome de imunodeficiência primária, fatal, recessiva ligada ao cromossomo X. A doença manifesta-se por quadro de poliendocrinopatia autoimune, enteropatia, eczema, citopenias imunomediadas, hepatite, nefropatia, colite e artrite (Barzaghi; Passerini; Bacchetta, 2012; Wildin, Smyk-Pearson; Filipovich, 2002). Aparentemente, esses pacientes têm comprometimento no desenvolvimento das Tregs e consequente defeito na função supressora dessas células (Sakaguchi, 2004).

Em estudos *in vitro*, as propriedades inibitórias das Treg foram evidenciadas em co-culturas com Treg e células CD4+CD25⁻ na presença de estímulo policlonal. Tais estudos demonstraram que a ação supressora das Tregs sobre células T CD4+CD25⁻ ou CD8⁺ é dependente de contato célula-célula, demonstrado pela inabilidade das Treg em inibir proliferação celular *in vitro* quando as populações celulares foram separadas por membrana semipermeável. Sobrenadantes de cultura de Tregs estimuladas também não demonstraram capacidade supressora (Baecher-Allen et al., 2001; Sakaguchi et al., 2009; Takahashi et al., 1998; Thornton et al., 1998).

O perfil de citocinas produzido por Tregs recém-isoladas caracteriza-se por baixos níveis de IFN-gama (interferon gama), TGF-beta e IL-10, e ausência de IL-2 e IL-4. Ao transferir o sobrenadante de cultura de Tregs para culturas de células CD4+CD25⁻ não se

observa efeito na proliferação celular, sugerindo que a supressão não é dependente de fatores solúveis (Thornton; Shevach, 1998; Baecher-Allen et al., 2001; Bacchetta; Gregori; Roncarolo, 2005).

Além dos linfócitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ derivados do timo, que expressam constitutivamente CTLA-4, GITR e Foxp3 (nTreg), há as células Treg adaptativas ou induzidas (iTreg), geradas a partir dos linfócitos T *naive* (linfócitos T maduros, virgens, em estado de repouso) na periferia. As iTreg mais comuns são as células Treg tipo 1 (Tr1) produtoras de IL-10, e as células Th3 produtoras de TGF-beta. Células Tr1 consistem em um subgrupo que não produzem Foxp3, secretam altos níveis de IL-10 e TGF-beta e têm capacidade imunorreguladora. Já as células Th3 secretam TGF-beta e IL-10 e expressam Foxp3, o que dificulta sua diferenciação das Treg de ocorrência natural (Peterson, 2012; Pot; Apetoh; Kuchroo, 2011; Taams et al., 2006). Assim, as células nTreg e iTreg apresentam funções próprias, não redundantes no sistema imunológico, sendo que as nTreg atuam principalmente mantendo a autotolerância contra antígenos próprios, e as iTreg, desenvolvendo resposta aos antígenos externos.

Desde a caracterização das Tregs, diversos autores têm estudado possíveis alterações no número ou função dessas células em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, uma vez que tais alterações poderiam contribuir na patogênese dessas doenças. As Treg apresentam sua função inibitória alterada em ensaios de co-cultura de monócitos periféricos de pacientes com psoríase, embora se apresentem normais em número no sangue periférico desses pacientes (Sugiyama et al., 2005). Redução na capacidade inibitória das Treg também foi observada em ensaios de proliferação *in vitro* em amostras de pacientes com esclerose múltipla (Viglietta et al., 2004), síndrome poliglandular autoimune tipo II (Kriegel et al., 2004), diabetes tipo I (Lindley et al., 2005) e na púrpura trombocitopênica autoimune (Ji et al., 2012). Na doença de Sjogren, observa-se expansão da população de Treg no sangue periférico, mais evidente nos casos com doença

controlada, sugerindo que a expansão dessa população celular possa estar envolvida no controle da resposta inflamatória desses pacientes (Alunno, 2012a).

No penfigóide bolhoso, em estudo envolvendo 26 pacientes sem tratamento e 30 controles pareados por idade e sexo, observou-se redução significativa em número das células CD4+CD25^{high}Foxp3+ no sangue periférico dos pacientes. Não houve correlação entre os níveis de Treg e extensão da doença (Quaglino et al., 2012).

A identificação de Treg em biópsias de pele pode ser realizada pela dupla marcação CD4+CD25+, porém células T induzidas podem também expressar o marcador CD25, sendo o marcador Foxp3 uma ferramenta importante nessa caracterização (de Boer et al., 2007; Hori et al. 2003). De Boer et al. (2007) observaram que quase todas as células que expressavam Foxp3 também expressavam CD4 e CD25 em amostras de pele normal, com psoríase e líquen plano. Número reduzido de células CD3+ e Foxp3+ é observado em amostras de pele normal (de Boer et al., 2007; Terras et al., 2013).

As células Treg também foram avaliadas quanto à possível alteração com o envelhecimento, e associação com os processos de autoimunidade e inflamação observados nos pacientes idosos. Há relato de declínio na função das Tregs com a idade (Tsaknaridis et al., 2003), porém, Sun et al. (2012) observaram que as células Tregs em camundongos jovens (4-8 semanas) e idosos (24-26 meses) cursaram com função supressora semelhante em ensaios de proliferação celular. No entanto, houve defeito na capacidade de as Treg dos animais idosos em conter processos inflamatórios crônicos, o que não ocorreu em inflamações agudas.

Tsaknaridis et al. (2003) não observaram diferença na capacidade supressora das Treg ao se comparar pacientes masculinos e femininos, porém houve aumento em número das Treg na gestação em humanos (Somerset et al., 2004; Tsaknaridis et al., 2003), que pode estar associado aos níveis de estrogênio (Prieto; Rosenstein, 2006).

Medicações sistêmicas podem alterar a proliferação e função das Treg. A ciclosporina reduz a função das Treg pela produção de IL-2 e IFN-gama. Já o micofenolato mofetil, tacrolimus e corticosteroides foram associados à supressão da proliferação das Treg e de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), porém sem interferir na capacidade supressora das Treg (Miroux et al., 2012a-b).

A manipulação celular visando terapias-alvo vem sendo estudada em relação às células Tregs. Aparentemente, há vasto potencial do uso das Tregs como agentes terapêuticos, como no tratamento do diabetes mellitus tipo I (Thompson; Perry; Brusko, 2012) e de tumores (Nishikawa; Sakagushi, 2014; Pastille et al., 2014; Pedroza-Gonzalez et al., 2012), na imunomodulação em pacientes transplantados, na prevenção da rejeição de órgãos sólidos (Sagoo; Lombardi; Lechler, 2012), em doenças reumáticas e no lúpus eritematoso sistêmico (Alunno et al., 2012b; Miyara; Ito; Sakagushi, 2014), entre outras doenças inflamatórias e autoimunes.

8. Pênfigos e Treg

A etiologia da autoimunidade nos pênfigos parece ter caráter multifatorial, em que a via comum final é a perda da autotolerância a moléculas do epitélio estratificado escamoso. Análises de fatores genéticos que contribuem para o PF e o PV demonstram que os alelos HLA constituem, provavelmente, fatores genéticos predisponentes importantes, uma vez que fazem parte do mecanismo de apresentação de antígenos (Loiseau et al., 2000; Martel et al., 2002; Moraes et al., 1991; Pavoni et al., 2003; Petzl-Erler; Santamaría, 1989).

A função do Foxp3 foi analisada nas células Tr1 através a supressão desse fator de transcrição. Como resultado, houve a mudança no padrão de produção de citocinas por essas células, que perderam a expressão de GITR e CTLA4, e passaram a secretar IL-2, perdendo assim sua função regulatória, apresentando fenótipo Th-2. Os autores concluíram que a

expressão de Foxp3 é inerente à função das células Tr1, sendo a modulação desse fator possível alvo na restauração da autotolerância no PV (Veldman et al., 2006).

Sugiyama et al. (2007) estudaram 11 pacientes com PV (4 em remissão e 7 em uso de imunossupressores) e 15 controles saudáveis, com idade variando de 46 a 74 anos no grupo PV, e 29 a 72 anos nos controles, bem como 5 pacientes com PF (2 em uso de imunossupressores). Evidenciaram redução de cerca de dez vezes do número de células Treg em relação ao total de células CD4+ em pacientes com PV, bem como da expressão de Foxp3, mas não em pacientes com PF, quando comparados aos controles. Não foi realizada na ocasião a análise da função das Treg nos pacientes com pênfigo, pelo número reduzido de células isoladas (Sugiyama et al., 2007).

Yokoyama et al. (2011) analisaram a importância de antígeno específico no desenvolvimento de Treg policlonais no PV em modelo experimental. Células do baço de camundongos Dsg3^{-/-} imunizados com Dsg3 foram transferidas para camundongos Rag2^{-/-}, resultando na formação de bolhas cutâneas, com fenótipo de PV. Nesses modelos, a transferência de Tregs suprimiu a produção de anticorpos anti-Dsg3, enquanto a depleção das Treg endógenas aumentou a produção desses anticorpos. Para avaliar se a expressão endógena de Dsg3 estaria envolvida na formação das Treg no PV, comparou-se Tregs de camundongos *wild* com as Treg dos camundongos Dsg3^{-/-}. As Treg policlonais dos camundongos Dsg3^{-/-} tiveram maior capacidade supressora que a dos camundongos *wild*, tanto nos experimentos de transferência quanto de depleção de Treg, enquanto a capacidade supressora contra a produção de IgG contra antígeno irrelevante foi semelhante quando comparou-se camundongos *wild* e Dsg3^{-/-}. Esse experimento demonstrou que Tregs capazes de suprimir células Th que estimulam a produção de anticorpos podem se desenvolver na ausência de antígenos alvo (Yokoyama et al., 2011).

A expressão de CD28 como possível agente implicado na autotolerância foi avaliada em doenças autoimunes, incluindo o PV (Alecú et al., 2009; Corse et al., 2013; Hu; Tao; He, 2004; Salomon et al., 2000). A molécula CD28 é expressa constitutivamente nas células T *naive* e células T ativadas e parece ser importante na formação, expansão e função das Treg, sendo a deleção do gene do CD28 acompanhada de perda seletiva de Tregs (Gogishvili et al., 2013; Zhang et al., 2013). Alecú et al. (2009), em 16 pacientes com PV e 10 controles, observaram, através de citometria de fluxo, não haver diferença entre as médias de linfócitos B, T e células *natural killer* (NK) entre pacientes com PV e controles. No entanto, os autores observaram redução de Treg no PV, corroborando com os achados de Sugiyama et al. (2007), expressão aumentada de CD28 em células Th e reduzida em Treg dos PV, quando comparados aos controles saudáveis.

Em biópsias de pele normal, células T são observadas em número absoluto reduzido em cortes histológicos, sendo detectada também a ocorrência de Treg, porém em número ainda menor (de Boer et al., 2007). Terras et al. (2013) observaram frequência aumentada de Treg em lesões de PV em relação à pele normal, embora sem significância estatística. Em 16 amostras de pele normal observou-se razão de mediana de células Foxp3/CD3+ de 0,5%, enquanto em amostras de PV (n=6), a razão foi de 5,4%, e de 10,1% em amostras de penfigóide bolhoso (n=8). Outro estudo demonstrou uma razão entre células Foxp3+/CD4+ semelhante em lesões de PV e PF, em torno de 20%, porém em maior número absoluto no PV (Arakawa et al., 2009; Terras et al., 2013).

3. Objetivos

Objetivo Geral

- Caracterizar a expressão das células Treg CD4+CD25+ no sangue periférico e nas lesões de pele de pacientes com PV e PF.

Objetivos Específicos

- Quantificar as células T CD4+CD25^{high} em relação ao total de células PBMC do sangue periférico em pacientes com PV e PF, e em controles saudáveis.
- Quantificar as células T CD4+CD25^{high} em relação ao total de células PBMC do sangue periférico em pacientes com PV e PF, e em controles saudáveis, com imunomarcção para CCR4 e CTLA4.
- Determinar a capacidade supressora das células Treg do sangue periférico de pacientes com PV e PF sobre a resposta proliferativa das células dos próprios pacientes, comparadas a células do sangue periférico de indivíduos sadios.
- Determinar a capacidade supressora das células T reguladoras do sangue periférico de pacientes com PV e PF sobre a resposta proliferativa das células dos controles saudáveis, comparadas a células do sangue periférico de indivíduos sadios.
- Caracterizar as células Treg na lesão e na área perilesional dos pacientes com PV e PF pela expressão de marcadores específicos.
- Correlacionar o número ou a função das Tregs com alelos HLA -DQ e -DR nos pacientes com PF e PV.

4. Métodos

Os pacientes elegíveis para o estudo foram provenientes do Ambulatório de Dermatoses Autoimunes do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), e participaram voluntariamente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto e o TCLE foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP (número 12.248/2010), de acordo com a resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

1. Casuística

Os critérios de inclusão de 15 pacientes com pênfigo foram assim elencados: (1) diagnóstico clínico e histopatológico de PF ou PV, com confirmação de acantólise intraepidérmica, e imunofluorescência direta positiva e ou ELISA positiva para anticorpos anti-Dsg; (2) atividade franca da doença, com presença do sinal de Nikolsky; e (3) ausência do uso de corticoides ou imunossupressores até 60 dias antecedendo a coleta das amostras de sangue e das biópsias de pele.

Foram considerados fatores de exclusão: mulheres grávidas, pacientes menores de 18 anos, comorbidades como neoplasias, doenças autoimunes concomitantes e imunodeficiência primária ou adquirida.

Grupo 1 (G1) - citometria de fluxo (Tabela 2)

Foram incluídos no G1 12 pacientes com pênfigo - 6 PF e 6 PV -, 8 pacientes do sexo masculino e 4, feminino, com mediana de idade de 42,5 anos (19-73; IC 29,2-56); com tempo de doença variando de 4 meses a 24 anos; sendo 4 deles virgens de tratamento sistêmico.

Doze controles saudáveis, 5 homens e 7 mulheres, com características de cor semelhante às dos pacientes, e mediana de idade de 29 anos (23-71; IC 27,2-33,2) foram incluídos.

Grupo 2 (G2)- proliferação celular (Tabela 3)

Foram incluídos 10 pacientes (dos quais 7 pertencem também ao G1, Tabelas 8 e 9), sendo 5 pacientes com PF e 5 com PV. Cinco pacientes eram do sexo masculino e 5 femininos, de cor predominantemente branca ou parda, com mediana de idade de 51,5 anos (19-73; IC 34,2-59,7) e tempo de doença variando de 4 meses a 24 anos.

Dez controles saudáveis foram incluídos para proliferação celular e co-cultura, pareados por faixa etária (maior ou menor que 50 anos) e cor, sendo 4 masculinos e 6 femininos, com mediana de idade de 30 anos (26-71; IC 29-38,2).

Não houve diferença estatística entre casos e controles, de acordo com as variáveis: idade, sexo e cor nos G1 e G2.

Tabela 2. Casuística dos pacientes com Pênfigo e Controles – Grupo Citometria (G1)

	PF (n=6)	Controles PF (n=6)	Teste t ou Fisher	PV (n=6)	Controles PV (n=6)	Teste t ou Fisher
Idade (anos)*	34 (22,7-53,2)	27,5 (25,2-29,5)	p=0,3	51 (34-64,7)	32,5 (29-56)	p=0,3
Sexo M/F	4/2	3/3	p=0,66	4/2	2/4	p>0,9
Cor branca / não branca	5/1	6/0	--	5/1	6/0	p=1

*Mediana e intervalo interquartil (25% e 75%)

Tabela 3. Casuística de pacientes com Pênfigo e Controles – Grupo co-cultura (G2)

	PF (n=5)	Controles PF (n=5)	Teste t ou Fisher	PV (n=5)	Controles PV (n=5)	Teste t ou Fisher
Idade (anos)*	35 (25,5-58)	29 (27,5-32)	p=0,31	53 (43-67,5)	34 (29-61)	p=0,06
Sexo M/F	2/3	2/3	p=0,3	3/2	2/3	p>0.99
Cor branca / não branca	4/1	5/0	--	4/1	5/0	--

*Mediana e intervalo interquartil (25% e 75%)

Os dados demográficos dos pacientes com PF e PV encontram-se nas tabelas 4 e 5, e os dados clínico-laboratoriais nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 4. Dados demográficos dos pacientes com pênfigo foliáceo

Paciente	Forma Clínica	Idade ^a	Cor	Sexo	Procedência
PF1	PF	52	Branco	M	Ribeirão Preto. Remota: Ituverava
PF2	PF	24	Branco	M	Sales de Oliveira
PF3	PF	33	Branco	M	Santa Ernestina
PF4	PF	57	Branca	F	Altinópolis. Remota: Guardinha-MG
PF5	PF	59	Branco	M	Cajuru no surgimento das lesões. Remota: S. Tomaz de Aquino-MG
PF6	PF	19	Branco	M	Franca
PF7	PF	35	Branca	F	Jaborandi
PF8	PF	32	Negra	F	Restinga

a. Idade em anos completos. M, masculino; F, feminino.

Tabela 5. Dados demográficos dos pacientes com pênfigo vulgar

Paciente	Forma Clínica	Idade ^a	Cor	Sexo	Procedência
PV1	PV	49	Branco	M	Franca
PV2	PV	36	Pardo	M	Barrinha
PV3	PV	53	Branco	M	Ribeirão Preto
PV4	PV	73	Branca	F	Ribeirão Preto
PV5	PV	62	Branca	F	Ribeirão Preto
PV6	PV	50	Branco	M	Araraquara. Remota: Guardinha-MG
PV7	PV	28	Branco	M	Ribeirão Preto

a. Idade em anos completos. M, masculino; F, feminino.

Tabela 6. Dados clínicos dos pacientes com pênfigo foliáceo

Paciente	Forma Clínica	Tempo de evolução	Tratamentos prévios	Tempo sem tratamento*	Fenótipo clínico	Comorbidades
PF1	PF	5 anos	Cloroquina, Prednisona	2 anos e 5 meses	Tronco superior e dorso (localizado)	--
PF2	PF	12 meses	Nenhum	n.a.	Disseminado	--
PF3	PF	17 meses	Dapsona, Prednisona	2 meses	Múltiplas lesões no tronco (disseminado)	--
PF4	PF	24 anos	Prednisona, MTX, Cloroquina	3 meses	1 lesão no dorso (localizado)	HAS
PF5	PF	19 anos	Prednisona, Cloroquina	18 anos	Disseminado	Úlcera córnea traumática
PF6	PF	4 meses	Nenhum	n.a.	Disseminado	--
PF7	PF	5 anos	MTX, Prednisona, pulso de MPL	7 meses	Disseminado	HAS, obesidade
PF8	PF	15 meses	Tópicos	n.a.	Disseminado	--

PF, pênfigo foliáceo; PV, pênfigo vulgar; MTX, metotrexate; n.a., não se aplica, pois paciente é virgem de tratamento sistêmico; MPL, metilprednisolona; HAS, hipertensão arterial sistêmica. * Tempo sem uso de medicações imunossupressoras sistêmicas.

Tabela 7. Dados clínicos dos pacientes com pênfigo vulgar

Paciente	Forma Clínica	Tempo de evolução	Tratamentos prévios	Tempo sem tratamento*	Fenótipo clínico	Comorbidades
PV1	PV	12 meses	Infiltração de triancinolona intralesional	n.a.	Lesões no couro cabeludo, face, tronco (disseminado)	DM em uso de Daonil e Metformina; HAS
PV2	PV	5 meses	Nenhum	n.a.	Lesões extensas nas mucosas oral e nasal; Exulcerações no tronco (disseminado)	Nenhuma
PV3	PV	27 meses	Prednisona, DCP	5 meses	Lesões no couro cabeludo (localizado)	Obesidade; HAS
PV4	PV	6 meses	Nenhum	n.a.	Lesões extensas na mucosa oral (localizado)	HAS, Doença do Refluxo Gastroesofágico
PV5	PV	18 meses	Prednisona	3 meses	Lesões no couro cabeludo (localizado)	Doença Arterial Coronariana
PV6	PV	46 meses	Prednisona, DCP, Cyc VO	2 meses	Lesões no couro cabeludo (localizado)	Nenhuma
PV7	PV	3 meses	Nenhum	n.a.	Lesões extensas na mucosa oral (localizado)	Nenhuma

PF, pênfigo foliáceo; PV, pênfigo vulgar; DCP, pulsoterapia de dexametasona e ciclofosfamida; n.a., não se aplica, pois paciente é virgem de tratamento sistêmico; Cyc, ciclofosfamida; VO, via oral; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes mellitus. * Tempo sem uso de medicações imunossupressoras sistêmicas.

Para os estudos de imunohistoquímica e microscopia confocal, foram coletadas biópsias de pele de 4 pacientes com PF e 2 com PV (Tabelas 8 e 9). Nesse grupo, 3 pacientes eram femininos e 3 masculinos, de cor predominantemente branca ou parda, com mediana de idade de 33,5 anos (18-57, IC 22,7-53) e tempo de doença variando de 4 meses a 24 anos. Foram coletadas amostras de pele perilesional de 3 PF e 2 PV, em área de pele aparentemente normal distando 2 centímetros da lesão biopsiada.

Realizou-se tipificação de HLA em 6 pacientes com PF e em 7 pacientes com PV.

Tabela 8. Distribuição dos pacientes com pênfigo foliáceo quanto à realização de Citometria de Fluxo, Ensaio de Proliferação Celular, Elisa Anti-Dsg (desmogleína 1/3), HLA Classe II DQ e DR, e histoquímica

Paciente	Forma clínica	Citometria de Fluxo	Ensaio de co-cultura	Anti-Dsg	HLA	Histoquímica
PF1	PF	X		X		
PF2	PF	X		X		X
PF3	PF	X		X	X	
PF4	PF	X	X	X	X	
PF5	PF		X		X	
PF6	PF	X	X	X	X	X
PF7	PF	X	X		X	X
PF8	PF		X	X	X	X

Tabela 9. Distribuição dos pacientes com pênfigo vulgar quanto à realização de Citometria de Fluxo, Ensaios de Proliferação Celular, Elisa Anti-Dsg (desmogleína 1 e 3), HLA Classe II DQ e DR, e histoquímica

Paciente	Forma clínica	Citometria de Fluxo	Ensaios de co-cultura	Anti-Dsg	HLA	Histoquímica
PV1	PV	X		X	X	
PV2	PV	X	X	X	X	
PV3	PV	X	X		X	
PV4	PV	X	X		X	
PV5	PV	X	X	X	X	X
PV6	PV		X	X	X	X
PV7	PV	X		X	X	

2. Técnica de ELISA para Anti-Dsg

A determinação de anticorpos da classe IgG anti-Dsg 1 e anti-Dsg 3 foi realizada pelo método ELISA, com kits comerciais MBL Co. Ltda, Nagoya, Japão, de acordo com as normas do fabricante.

3. Técnica de PCR para determinação de HLA

A extração de DNA do sangue periférico foi realizada pelo método *Salting-out*. A tipificação dos alelos HLA-DQ e -DR foi realizada por meio da hibridização do DNA amplificado por PCR com sondas de oligonucleotídeos sequência-específicas SSO de alta resolução para o loco -DR, SSO de baixa resolução para os locos -DQA e DQB, e alelos específicos micro SSP-DQB1 e DQA1, utilizando kits comerciais fornecidos pela empresa One Lambda (Canoga Park, Califórnia, EUA), tecnologia Luminex[®], de acordo com as normas do fabricante.

4. Obtenção de PBMC para Citometria de Fluxo e Ensaio de Proliferação Celular

Para obtenção das PBMCs de pacientes com pênfigo e controles sadios, foram coletados 40 ml de sangue periférico em tubo heparinizado. Após a coleta, diluiu-se o sangue total em igual volume de PBS (salina fosfatada tamponada), adicionou-se Ficoll/Hypaque (BD Biosciences), e centrifugou-se a 400 x g por 30 minutos, à temperatura ambiente (TA). A interface obtida, contendo PBMC, foi coletada e centrifugada por 10 minutos a 400 x g e lavada duas vezes. Após esse procedimento, o sedimento foi ressuspenso em 3 ml de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, e os leucócitos, quantificados em câmara de Neubauer e imediatamente utilizados nos experimentos.

5. Caracterização Fenotípica das PBMC e Análise de Treg por Citometria de Fluxo

Para a caracterização fenotípica das células das PBMC de pacientes com PV, PF e controles, a expressão dos seguintes marcadores de superfície foi avaliada: CD4, CD25, CCR4, CLTA4, e do fator de transcrição intracelular Foxp3. Os anticorpos utilizados, conjugados aos fluorocromos FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PECy7 (ficoeritrina cianina), APC (alofico-cianina), encontram-se na Tabela 10. Isotipos controles foram incluídos em todos os ensaios, sendo utilizados como controles negativos. Todos os anticorpos foram previamente titulados.

Tabela 10. Anticorpos utilizados na Citometria de Fluxo

Especificidade Anticorpo	Fluorocromo	Fornecedor	Código de Catálogo
Anti-CD4	FITC	BD Pharmingen	555346
Anti-CD4	PE	BD Pharmingen	555347
Anti-CD4	PECy7	eBioscience	25-0049-42
Anti-CD4	APC	BD Pharmingen	555349
Anti-CD25	PECy7	eBioscience	25-0259-42
Anti-CD152 (CTLA-4)	PE	eBioscience	12-1528-42
Anti-Foxp3	PE	eBioscience	12-4777-42
Anti-CCR4	PE	BD Pharmingen	551120

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PECy7, ficoeritrina cianina; APC, alofocianina.

Após contagem de PBMC, 2×10^5 células foram lavadas, ressuspendidas em 100 μ L de PBS e incubadas com soro de coelho saudável diluído 1:20 (para bloquear ligações inespecíficas) por 30 minutos à TA. Em seguida, adicionou-se os anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície determinados acima, na proporção de 1 μ L para cada 10^6 células, seguidos por incubação de 30 minutos a 4°C, de acordo com instruções do fabricante. Após a incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas em PBS. Para a marcação intracelular da molécula Foxp3, as células foram fixadas e permeabilizadas, utilizando-se o kit “*Human Foxp3 buffer set*” (eBioscience), de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram processadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences), e analisadas nos *softwares* FACSDiva (BD Biosciences) e Flow Jo (TreeStar, Ashland, EUA).

6. Separação das subpopulações de Células T e co-cultura

Para avaliar a capacidade imunoreguladora das células Treg de amostras de pacientes com pênfigos e controles, realizaram-se ensaios de co-cultura.

PBMC previamente separadas por gradiente de Ficoll/Hypaque (BD Biosciences) foram quantificadas em câmara de Neubauer. Após serem lavadas em PBS-BSA-EDTA (0,5% de BSA e 3mM de EDTA), foram suplementadas com *beads* magnéticas anti-CD4 para separação da subpopulação de linfócitos T, e anti-CD25 (Miltenyi Biotec, BergishCladbach, Germany). Posteriormente, as células foram magneticamente selecionadas por *MACS®-sorting* de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do processo, obtivemos células CD4⁺CD25⁺ purificadas, que foram novamente contabilizadas em Câmara de Neubauer para proceder ao cultivo.

Uma fração de PBMC de pacientes com pênfigo e dos controles foi marcada com CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Sigma), e cultivada na presença das células CD4⁺CD25⁺ purificadas de indivíduos dos grupos citados (PBMC de paciente na presença das células CD4⁺CD25⁺ do próprio paciente e de controle sadio, bem como PBMC de controles na presença de células CD4⁺CD25⁺ do controle e de paciente com pênfigo), na proporção de 1 célula CD4⁺CD25⁺ purificada para 10 PBMC ou 1 célula purificada para 5 PBMC, perfazendo um total de 2×10^5 células por poço, em placas de 96 poços de fundo chato (Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA), contendo 200µl de meio RPMI completo, e estimuladas com anti-CD3 humano na concentração de 2,5µg/ml (anti-CD3mAb; BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA). Após 96 horas de cultura a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂, as células foram processadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Para cada poço, a diluição do CFSE foi analisada. Controles na ausência de estímulo policlonal com anti-CD3 apresentaram proliferação mínima ou ausente, e o estímulo com anticorpo anti-CD3 promoveu proliferação significativa em todas as amostras utilizadas.

7. Preparo das Amostras de Pele e Obtenção dos Cortes

As biópsias de pele dos pacientes com pênfigo foram incluídas em meio de criopreservação O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura, Finetechnical Co, Tokio, Japan) e congeladas gradativamente em um recipiente contendo isopentano liquefeito (Reagen), resfriado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -80°C até o processamento. Quinze fragmentos de $5\ \mu\text{m}$ de espessura de cada amostra foram obtidos em criostato, em lâminas de vidro silanizadas e fixados com acetona a 4°C por 10 minutos. Os cortes foram armazenados a 80°C até o procedimento.

8. Coloração Histológica convencional Hematoxilina-Eosina

Para certificarmos-nos da qualidade e preservação do tecido, um fragmento de cada corte obtido em criostato foi submetido à coloração histológica por Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e eosina (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, BR). Os cortes foram submetidos a três banhos de água corrente por 5 minutos cada e corados com hematoxilina durante 60 segundos. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao banho de água corrente e então, os cortes foram corados com eosina durante 30 segundos. Posteriormente, realizou-se desidratação por passagens em sequência de banhos em álcool (Synth, Merck, Darmstadt, Alemanha) 80%, 95% e três banhos com álcool 100%. Em seguida, foram realizadas três passagens em xilol (Synth, Merck, Darmstadt, Alemanha) para diafanização e finalmente, as lâminas foram montadas com *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

9. Técnica de Imunohistoquímica

Os cortes foram submetidos à técnica da imunohistoquímica para a determinação da expressão de Foxp3. O anticorpo para IHQ utilizado neste trabalho foi previamente titulado,

com suas especificações descritas na Tabela 11. Realizou-se controle positivo em biópsia de pele de lesão de esporotricose.

Tabela 11. Anticorpo utilizado na Imunohistoquímica (IHQ)

Especificidade Anticorpo Primário	Origem	Código de Catálogo	Fornecedor	Titulação utilizada na IHQ
Foxp3	Monoclonal camundongo	SC56680	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:50

As lâminas, previamente fixadas em acetona, foram descongeladas em TA por 30 minutos. Realizou-se lavagem em PBS 2 vezes e procedeu-se à inibição da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio em PBS por 30 minutos à TA, no escuro. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de três minutos cada com PBS, seguido da etapa de bloqueio de reações inespecíficas (relacionadas ao anticorpo secundário), adicionando-se Blackground Block (927B-02 Cell Marque, USA) por 10 minutos, à TA. Os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica, e o anticorpo primário, diluído em BSA1%/PBS segundo a Tabela 11. Adicionou-se 50µL do anticorpo primário previamente diluído em cada corte, que foram mantidos na câmara úmida por 120 minutos à TA. Após esse período, foram lavados em PBS 2 vezes, por 3 minutos cada lavagem. Os cortes foram então incubados com 50µL de *Amplifier – HiDef Detection HRP Polymer System* (954D-11 Cell Marque, USA) por 10 minutos, à TA. Após esse período, lavou-se em PBS 2 vezes por 3 minutos cada e adicionados 50 µL do *HRP Polymer Detector – HiDef Detection HRP Polymer System* (954D-12 Cell Marque, USA) por 10 minutos, à TA. Os cortes foram novamente lavados em PBS 2 vezes, por 3 minutos cada. A seguir, acrescentou-se o substrato cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB + substrate, Chromogen System, DAKOCytomation – Carpinteria – USA), preparado conforme instruções do fabricante, 50 µL por corte, no escuro,

e lavados. Posteriormente, os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavados em água corrente por 3 minutos. Finalmente seguiu-se a desidratação dos cortes em banhos crescentes de álcool, e por fim, banhos de xilol. As lâminas foram montadas com *Entellan* e lamínula para posterior observação em microscópio óptico.

As lâminas utilizadas como controle negativo não foram incubadas com o anticorpo primário, entretanto com o restante da técnica de forma semelhante.

10. Técnica de Microscopia Confocal

A imunofluorescência direta com os marcadores CD4 e CD25 foi realizada utilizando cortes de 5 µm de espessura em lâminas silanizadas. Os anticorpos e suas especificações estão mostrados na Tabela 12. Os anticorpos foram previamente titulados.

Tabela 12. Anticorpos utilizados na microscopia confocal

Anticorpo Primário	Origem	Código de Catálogo	Fornecedor	Titulação utilizada
CD4	Goat	SC1140	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:50
CD25	Mouse	SC 57297	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:50
Anticorpo Secundário		Código de Catálogo	Fornecedor	Titulação utilizada
Fluorocromo	Origem			
AF488	Donkey anti-goat	A11055	Invitrogen	1:500
AF647	Donkey anti-mouse	A31675	Invitrogen	1:500

As reações foram feitas com cortes armazenados a -80°C. Os cortes foram descongelados à TA por 30 minutos, e submetidos a uma sequência de três banhos de 15 minutos com PBS-Triton, seguidos de três banhos com PBS-Glicina 0,1 M, 10 minutos cada. Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com PBS/BSA 1% (BSA,

soro albumina bovina) durante 30 minutos à TA. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais diluídos 1:50 em PBS/BSA 1%. Os cortes foram incubados *overnight* a 4°C. Posteriormente, realizaram-se três banhos de 10 minutos em PBS-Glicina, e as lâminas foram secas. Adicionaram-se, então, os anticorpos secundários, 1:500, diluídos em PBS-BSA 1%. Após 1 hora de incubação à TA e ao abrigo da luz, foram realizadas três lavagens adicionais, seguidas da montagem com VectaShield™ (Vector Laboratories, CA, U.S.A) e armazenadas a 4°C, protegidas da luz por, no máximo, 72 horas, até que fosse realizada a aquisição das imagens no Microscópio Confocal a laser Zeiss LSM 510 Meta/UV.

11. Análise Estatística – Citometria e Cultura

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism (versão 6.0). Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Wilcoxon comparando o início do co-cultivo com os diferentes momentos após a co-cultura. Teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar diferenças entre os grupos de indivíduos. Teste Kruskal-Wallis foi realizado para múltiplas variáveis, seguido de comparação múltipla de Dunn. A significância estatística foi definida como $p \leq 0,05$.

12. Análise Estatística – Comparação de variáveis

Para verificar o grau de correlação entre o número de Treg e as variáveis: títulos de anti-Dsg, tempo sem tratamento imunossupressor e tempo de evolução do pênfigo, utilizou-se o teste de correlação não paramétrico de Spearman, com significância estatística definida como $p \leq 0,05$. Coeficiente de correlação (r) = -1, correlação perfeita negativa; $r = 0$, correlação nula; $r = 1$, correlação perfeita positiva; $0,2 < r < 0,4$, correlação fraca; $0,4 < r < 0,7$, correlação moderada; $0,7 < r < 0,9$, correlação forte, possuindo o mesmo significado para os casos negativos ou positivos.

13. Análise descritiva – IHQ e Microscopia Confocal

A imunomarcção de Treg Foxp3 foi observada subjetivamente por microscopia óptica, visando caracterizar a presença e distribuição desse substrato nas amostras de lesão e nas amostras perilesionais. À microscopia confocal, analisou-se a presença de dupla marcação CD4+CD25+ por fluorescência, observando a distribuição nas amostras.

5. Resultados

1. Dosagem de Anticorpos Anti-desmogleína

Dos 8 casos de PF, realizou-se dosagem de anticorpos anti-Dsg, no mesmo momento da coleta do sangue para quantificação de Treg, em 6 pacientes. Todos apresentaram positividade dos anticorpos anti-Dsg1, corroborando com a atividade da doença, observada clinicamente e pela presença do sinal de Nikolsky.

Dentre os 7 pacientes com PV, a dosagem de anticorpos anti-Dsg 1 e 3 foi realizada no mesmo momento em 5 pacientes. Desses, 3 apresentaram autoanticorpos anti-Dsg 1 e 3, um deles apenas anti-Dsg1, e um paciente, apenas anti-Dsg3 (Tabela 14).

2. Citometria de fluxo

Comparou-se as proporções de células T CD4+CD25+ e de CD4+CD25^{high} em relação ao total de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo, nos grupos de pacientes com PV (n = 6), PF (n = 6) e controles saudáveis (n = 12), Figura 2.

A mediana da porcentagem das células CD4+CD25+/PBMC(%) no sangue periférico de pacientes com PV foi de 3,61%, nos pacientes com PF, de 2,1%, e de 3,4% no grupo controle, não havendo diferença na frequência dessa população celular entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (p=0,15) (Figura 3).

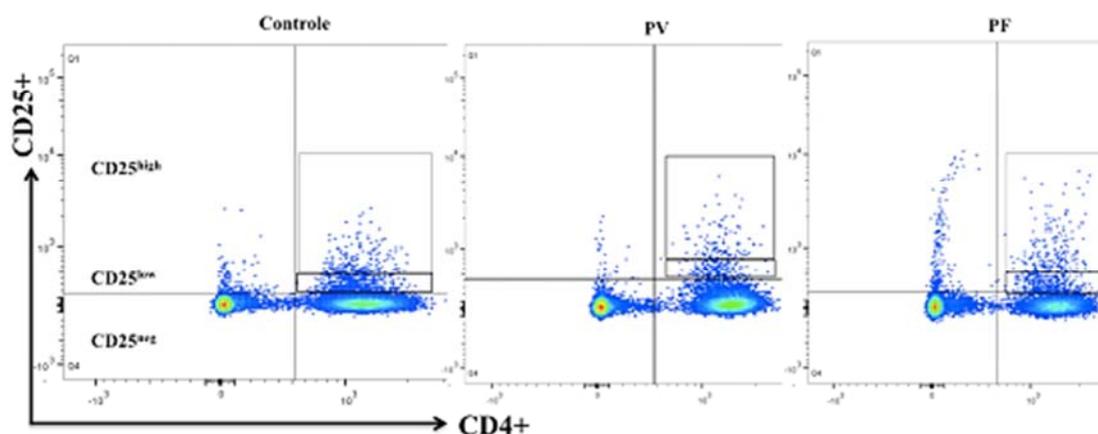


Figura 2. Células Treg CD4+CD25^{high} no sangue periférico de um controle saudável, paciente com PV e paciente com PF. Diagrama representativo da citometria de fluxo, que foi realizada em 12 experimentos independentes, demonstrando a marcação CD4+, CD25+ e CD25^{high} para a quantificação de Treg. Softwares FACSDiva (BD Biosciences) e Flow Jo (TreeStar, Ashland, EUA).

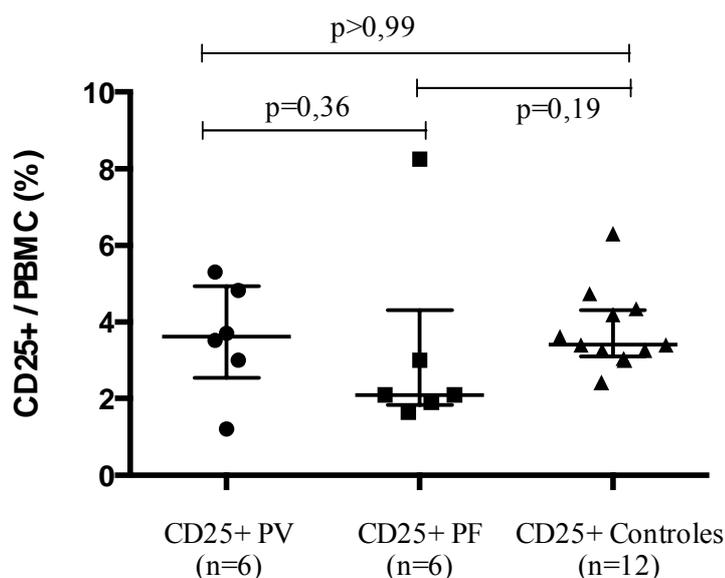


Figura 3. Frequência de células T CD4+CD25+ no sangue periférico de pacientes com pênfigo vulgar (PV), pênfigo foliáceo (PF) e controles saudáveis em relação às PBMC. Os resultados da citometria de fluxo demonstram o percentual de células imunomarcadas com CD4 e CD25 em relação ao total de PBMC. Não houve diferença significativa entre o total de células CD4+CD25+ nos grupos de pacientes com PV, PF e controles. As linhas horizontais representam as medianas e as barras, o intervalo interquartil.

Em relação às células Treg CD4+CD25^{high}, no grupo PV a mediana de Treg/PBMC(%) foi de 1% (0,86-1,11; n = 6), no grupo PF, 1,01% (0,7-1,33; n = 6), e nos controles, 1,57% (1,16-1,87; n = 12), havendo diferença entre os três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (p=0,009), cuja comparação múltipla de Dunn resultou significativa entre PV e controles (p=0,02), bem como entre PF e controles (p=0,05), Tabela 14.

Ao agruparmos pacientes com PF e PV, comparados aos controles, a porcentagem de Treg CD4+CD25^{high} é menor no grupo dos pênfigos (p=0,0013) (Figuras 4 e 5).

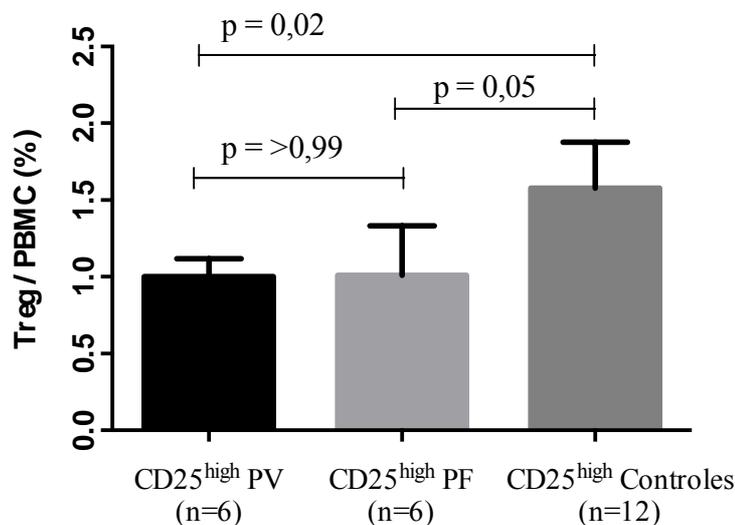


Figura 4. Frequência de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com pênfigo vulgar (PV), pênfigo foliáceo (PF) e controles saudáveis em relação às PBMC. Os resultados da citometria de fluxo demonstram o percentual de células imunomarcadas com CD4 expressando altos níveis de CD25 (CD25^{high}), em relação ao total de PBMC, em pacientes e controles. Observa-se que as células CD25^{high} encontram-se reduzidas no PV e no PF, comparadas aos controles. As linhas horizontais representam as medianas e as barras, o intervalo interquartil.

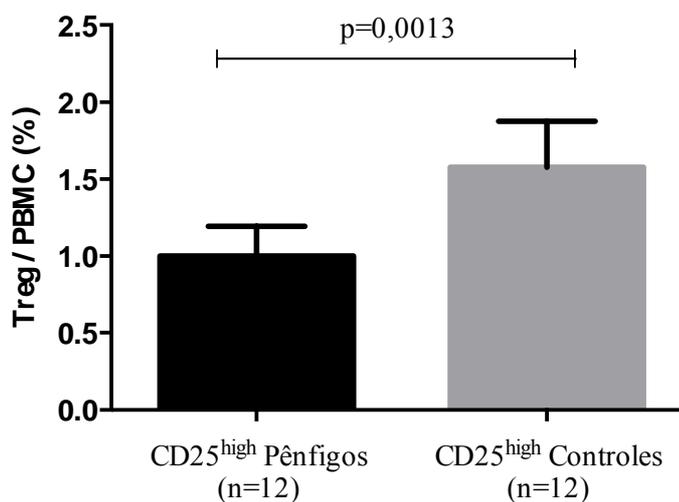


Figura 5. Frequência de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com pênfigo e controles saudáveis em relação às PBMC. Os resultados da citometria de fluxo demonstram o percentual de células marcadas com CD4 expressando altos níveis de CD25 (CD25^{high}), em relação ao total de PBMC, em pacientes e controles. As células CD25^{high} encontram-se reduzidas nos pênfigos, comparadas aos controles. As linhas horizontais representam as medianas e as barras, o intervalo interquartil.

Quando estratificados por idade, não houve diferença na frequência de células CD4+CD25^{high} entre pacientes com PV ou PF com idade menor ou maior que 50 anos ($p>0,99$) (Figura 6).

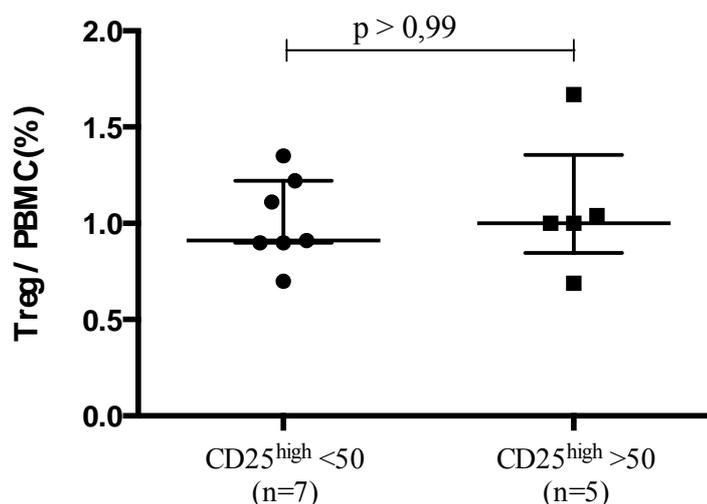


Figura 6. Frequência de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com pênfigo em relação às PBMC, estratificadas por idade. O resultado da citometria demonstra que não houve diferença entre o percentual de células CD4+CD25^{high} no sangue periférico de pacientes com idade maior ou menor que 50 anos. As linhas horizontais representam as medianas e as barras, o intervalo interquartil.

Ao estratificar-se os pacientes com PF ou PV por gravidade – forma localizada *versus* disseminada – ou por realização de tratamento prévio com imunossupressores em relação *versus* pacientes virgens de tratamento, não houve diferença estatística na frequência das células CD4+CD25^{high} ($p>0,99$ e $p=0,9$, respectivamente).

Não havendo diferença estatística na frequência das células CD4+CD25^{high}Foxp3+ quando se comparam os grupos PF e PV, ao agrupá-los, observou-se menor expressão dessas células entre os pacientes com pênfigo comparados aos controles ($n=10$, $p=0,0014$; Figura 6). Houve menor expressão de CCR4 entre as células CD4+CD25^{high} nos pênfigos, quando comparada às dos controles ($p=0,04$), porém não se observou diferença na expressão de CTLA4 entre as células CD4+CD25^{high} de pacientes e controles ($p=0,16$; Figura 7).

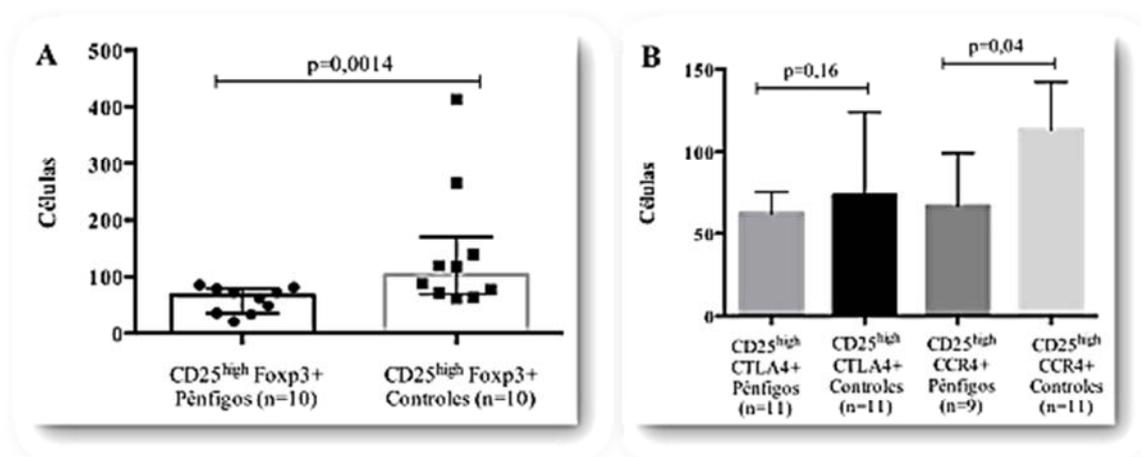


Figura 7. Quantificação de células $CD4+CD25^{high}Foxp3+$, $CD4+CD25^{high}CCR4+$ e $CD4+CD25^{high}CTLA4+$ no sangue periférico de pacientes com pênfigo e controles por citometria de fluxo. **A:** A ordenada mostra o número absoluto de células imunomarcadas com CD4, CD25 e Foxp3 em amostra de 2×10^5 células PBMC. Observar redução em número das células $CD4+CD25^{high}Foxp3+$ entre pacientes com pênfigo, comparados aos controles ($p=0,0014$). As linhas horizontais representam as medianas e as barras, o intervalo interquartil. **B:** A ordenada mostra o número absoluto de PBMC expressando $CD4+CD25^{high}CTLA4+$ e $CD4+CD25^{high}CCR4+$. Observar redução em número das células $CD4+CD25^{high}CCR4+$ entre pacientes com pênfigo, comparados aos controles ($p=0,04$). As linhas horizontais representam as medianas e as barras, o intervalo interquartil.

Não foi observada forte correlação entre títulos de anticorpos anti-Dsg, período de tempo sem uso de tratamento imunossupressor ou tempo de duração da doença e a frequência das células $CD4+CD25^{high}$ no sangue periférico ($r = -0,15$; $r = -0,16$; $r = 0,19$, respectivamente, Figura 8).

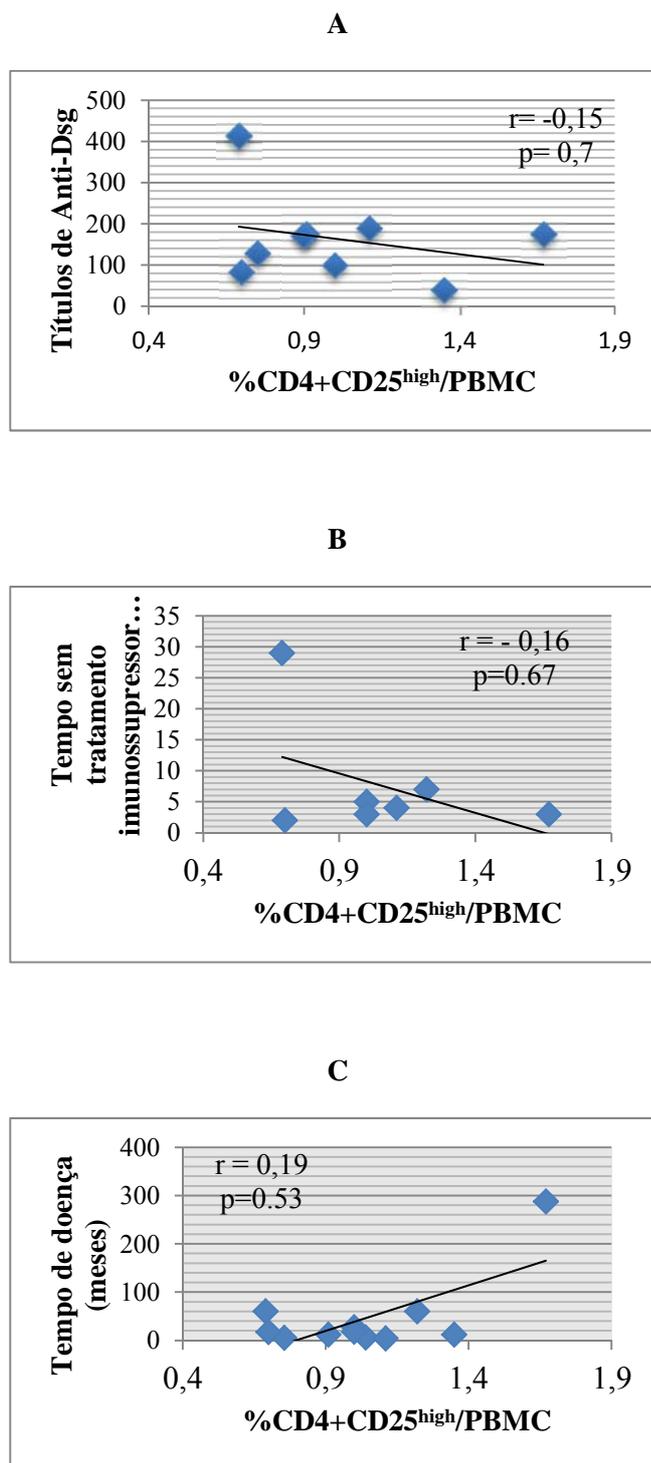


Figura 8. Correlação entre o número de Tregs no sangue periférico e os títulos de autoanticorpos anti-Dsg, tempo sem tratamento imunossupressor e tempo de doença. (A) Nos pacientes com PV apresentando positividade para anti-Dsg 1 e 3, utilizou-se o resultado de maior titulação. (B) Pacientes virgens de tratamento não foram representados. Não houve significância estatística ou correlação forte nas 3 associações. Coeficientes de correlação de Spearman, valor de p e linhas de regressão correspondentes foram demonstrados nas figuras.

3. Caracterização dos alelos HLA

Os alelos HLA mais frequentemente encontrados entre os pacientes com PF foram: DQA1*01:01/04/05 (alelo não descrito), presente em 4 dos 6 pacientes. Os seguintes alelos, descritos como alelos de susceptibilidade para PFE em população brasileira, foram observados: DRB1*01:02 em 3/6 pacientes, e o DRB1*04:04 em 2/6 pacientes. Já os alelos DQB1*04:02 e DQA1*03:01 (alelos não descritos), estiveram presentes em 2 dos 6 pacientes.

Entre os pacientes com PV, os alelos HLA mais prevalentes, presentes em 3/7 pacientes, foram: DRB1*14:02 (o alelo *14 é descrito como de susceptibilidade em população brasileira), DQA1*01:01/04/05 (alelo de susceptibilidade em iranianos, paquistaneses, judeus não Ashkenasi, entre outros) e DQA1*03:01 (alelo de susceptibilidade nas populações japonesa e judaica). Em seguida, observados em 2/7 pacientes, estiveram presentes os alelos: DRB1*04:02 (alelo de susceptibilidade em muitas populações, incluindo a brasileira), DRB1*04:04 (alelo de susceptibilidade em argentinos e iranianos), DRB1*14:04 (alelo de susceptibilidade em muitas populações), DQA1*05:05 (alelo de susceptibilidade em judeus), DQA1*05:03 (alelo não descrito), DQB1*03:01 (alelo de susceptibilidade na população Iraniana) e o alelo DRB1*05 (alelo de susceptibilidade em muitas populações) (Tabelas 1 e 13).

O alelo HLA DQB1*03:02 foi observado em 3 pacientes desse estudo (1 PF ; 2 PV). Dois desses pacientes tiveram Treg quantificadas por citometria (pacientes PV1 e PV3), e dois, sua função analisada em ensaio de proliferação (1 PF; 1 PV). Tendo-se o conhecimento de que o alelo HLA DQB1*03:02 esteve associado à apoptose de células Treg em diabéticos (Glisic et al., 2009), ao compararmos a frequência de células CD4+CD25^{high} em relação às PBMC do sangue periférico dos pacientes com pênfigo apresentando o alelo HLA DQB1*03:02 (PV1 e PV3, sendo que um paciente apresentou homozigose), com os grupos de pacientes com

pênfigo (excluídos aqueles com alelo HLA DQB1*03:02) e controles, não se observa diferença estatística entre os pacientes HLA DQB1*03:02 e os 2 grupos (Figura 9).

Dos pacientes que apresentaram HLA DQB1*03:02, realizou-se ensaio de co-cultura em dois deles (PF5 e PV3). Também não foi observada significância estatística ao compararmos a capacidade de inibição de proliferação das Treg de pacientes com pênfigo expressando o alelo HLA DQB1*03:02, com o grupo de pacientes com pênfigo (excluídos aqueles com alelo HLA DQB1*03:02) e controles (PMBC e CD25+ do próprio paciente e PBMC e CD25+ do próprio controle nos poços de cultura, $p=0,37$).

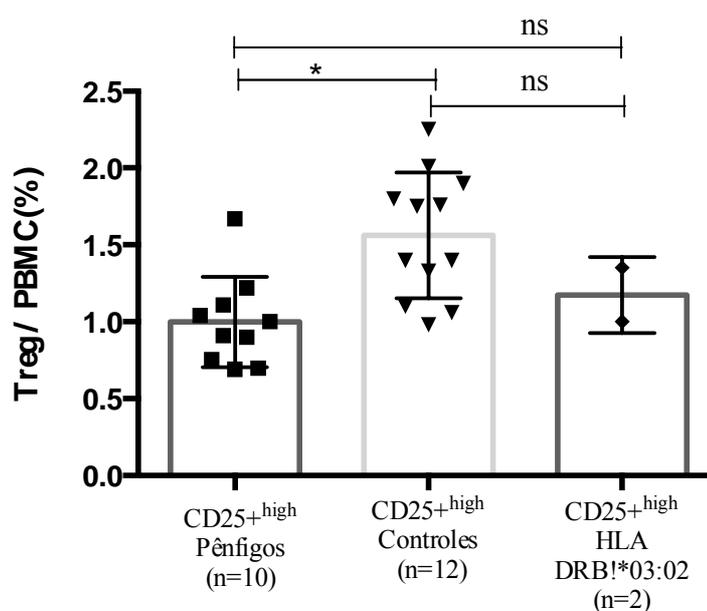


Figura 9. Frequência de células CD4+CD25^{high} em relação às PBMC do sangue periférico de pacientes com pênfigo (excluídos aqueles que expressam o alelo HLA DQB1*03:02) e controles, comparados aos pacientes que expressam o alelo HLA DQB1*03:02 (2PV). O teste de Kruskal Wallis evidenciou diferença entre os grupos, e seguido de comparação múltipla de Dunn, observamos diferença significativa ($p=0,006$) já descrita anteriormente, entre o grupo pênfigo e controles, mas não entre o grupo HLA DQB1*03:02 e os demais. Asterisco destaca diferença estatisticamente significativa. ns. não significante.

Tabela 13. Caracterização dos alelos HLA e quantificação de CD25^{high} no sangue periférico dos pacientes com pênfigo

Id./FC	CD25 ^{high}	Alelos HLA					
		DRB1	DRB1	DQA1	DQA1	DQB1	DQB1
PF1	0,69	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
PF2	0,91	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
PF3	0,7	01:02	03:01	01:01/04/05	05:01	02:01	06:02
PF4	1,67	01:02	08:02	01:01/04/05	04:01	04:02	05:01
PF5	n.r.	01:02	04:04	01:01/04/05	03:01/02/03	03:02	05:01
PF6	1,11	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
PF7	1,22	01:01	15:03	01:01/04/05	01:02	05:01	06:02
PF8	n.r.	04:04	08:02	03:01	03:01/04/05	04:02	04:02
PV1	1,35	04:02	04:04	03:01	03:01/02/03	03:02	03:02
PV2	0,75	08:04	16:02	05:05/09	05:05/09	03:01	03:01
PV3	1	04:02	11:04	03:01	05:05/09	03:01	03:02
PV4	1,04	11:02	14:02	05:01	05:03/07	03:01	03:01
PV5	1	14:02	14:04	01:01/04/05	05:03/07	03:01	05:03/08/10
PV6	n.r.	01:01	14:04	01:01/04/05	01:01/04/05	05:01/07/11	05:03/06/08/09/10
PV7	0,9	14:02	15:02	01:01/04/05	01:03	05:03/08/10	06:01

Id. Identificação do paciente; FC: forma clínica do pênfigo. Em azul: alelos de susceptibilidade; em vermelho: alelos de resistência (Tabela 1). Em verde: alelo associado à apoptose de células Treg em diabéticos. CD4+CD25^{high}: Percentual de células em relação às PBMC do sangue periférico. n.r., não realizado.

4. Ensaios de co-cultura

Visando analisar a capacidade supressora das células T CD4+CD25+ dos pacientes com pênfigo quando comparadas às de controles saudáveis, cultivou-se células de PBMC de PV, PF e controles, na presença de anticorpo anti-CD3 humano e CD4+CD25+ isoladas dos próprios pacientes (autólogas) e dos controles (Figura 10). Anticorpos anti-CD3 foram

utilizados com a intenção de promoverem estímulo proliferativo via receptor de células T (TCR) (Li e Kurlander, 2010). A capacidade supressora das células CD4+CD25+ foi analisada em cada amostra, comparada com a presença de células CD4+CD25- (dados não demonstrados).

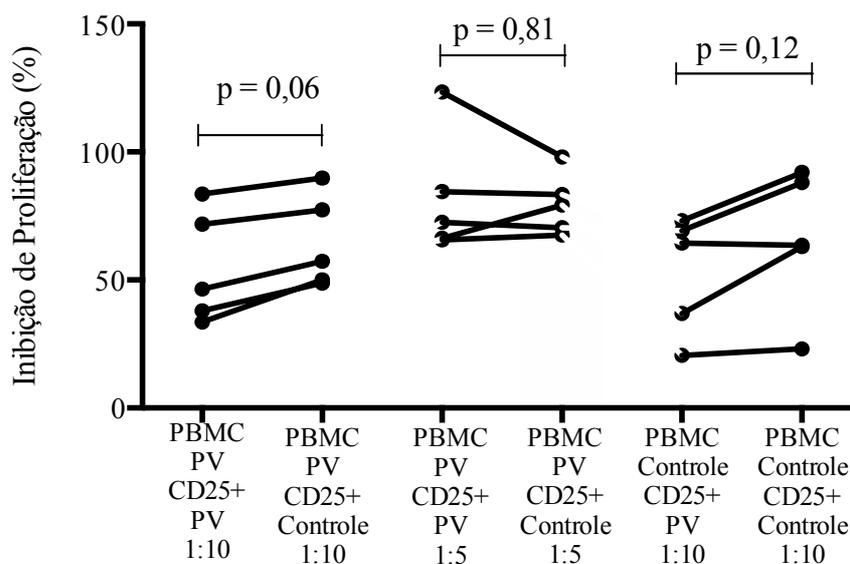


Figura 10. Efeito inibitório na proliferação de PBMC estimuladas por anti-CD3, na presença de células CD25+ de pacientes com PV e controles. À esquerda do gráfico, ilustra-se a porcentagem de inibição da proliferação de PBMC de pacientes com PV na presença de células CD25+ (1:10) do próprio paciente e do controle. No centro, ilustra-se a porcentagem de inibição da proliferação de PBMC de pacientes com PV na presença de células CD25+ (1:5) do próprio paciente e do controle. À direita, porcentagem de inibição da proliferação de PBMC dos controles na presença de células CD25+ (1:10) de pacientes com PV e autólogas. Não houve diferença significativa na capacidade de células CD25+ de pacientes e controles em inibir a proliferação de PBMC, seja dos próprios pacientes ou dos controles, na proporção de 1 célula CD25+ para cada 5 PBMC ou 1 célula CD25+ para cada 10 células de PBMC.

Nos ensaios de proliferação celular, as células CD4+CD25+ de pacientes e dos controles inibiram de forma semelhante a proliferação celular em resposta ao estímulo com anti-CD3, nas proporções de 1 célula CD4+CD25+ para cada 10 PBMC, e mais intensamente na proporção de 1:5 PBMC. Porém, só foi significativa a inibição com CD4+CD25+ na proporção 1:5 PBMC (Figura 11).

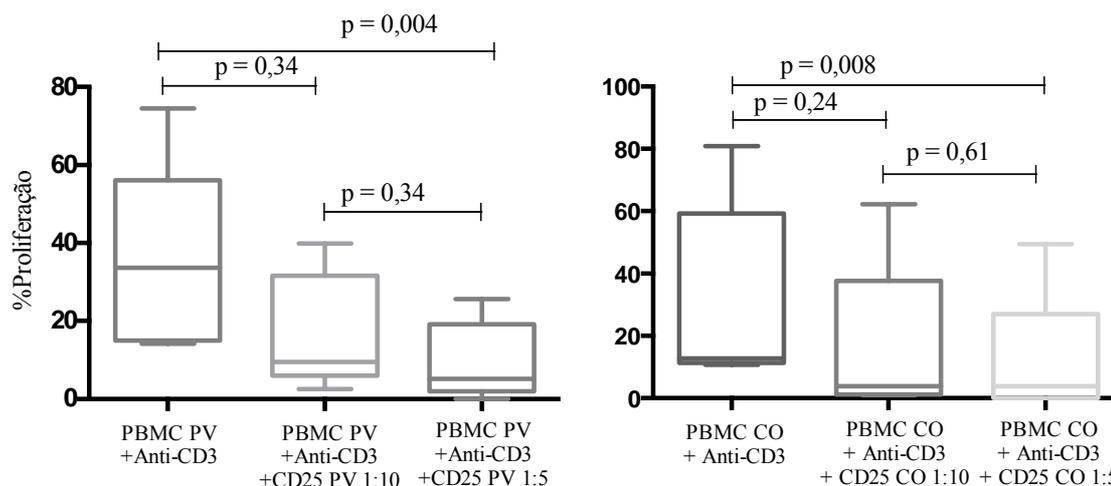


Figura 11. Efeito inibitório das células CD4+CD25+ na proliferação de PBMC de pacientes com PV e controles (CO), mediante estímulo com anti-CD3. A presença das células CD4+CD25+ inibe a proliferação de PBMC, que se torna mais pronunciada com o aumento da concentração dessas células na cultura. Porém, só foi significativa a inibição com CD4+CD25+ na proporção 1:5 PBMC. Resultados expressam mediana de 5 experimentos independentes em pacientes com PV e controles saudáveis pareados (Teste de Friedman para amostras pareadas, seguido de comparações múltiplas de Dunn).

Na razão de 1:10, nos pacientes com PV (n=5) observou-se inibição da proliferação de PBMC autólogos, em média de 54,6% (33,5-83,5; dp = 21,9), enquanto na mesma proporção, as células dos controles inibiram PBMC de pacientes com PV em 64,6% (48,8-89,8; dp = 18,1) (p=0,06). Ainda, entre os pacientes com PV, na razão de 1:5, as células CD25+ inibiram PBMC autólogas em média de 82,5% (65,6-123,4; dp = 24,1), enquanto, na mesma proporção, as células dos controles inibiram PBMC dos pacientes em 79,7% (67,5-98,1; dp = 12,1) (p=0,81). Na razão de 1:10, as células CD4+CD25+ de controles (n=5) inibiram PBMC autólogos em média 65,9%, e as dos pacientes com PV, 52,8% (p=0,12). Não houve, portanto, diferença estatística na capacidade de supressão pelas Treg de pacientes com PV e controles, em PBMC autólogos ou co-cultivados (Figura 10).

Entre pacientes com PF (n=5), também na razão de 1:10, observou-se média de inibição de 66,5% da proliferação de PBMC autólogos (41,3-104,1; dp = 26,6), e as células dos controles inibiram a proliferação de PBMC dos pacientes em 65,9% (44,6-104; dp = 25,3), (p=0,6). Na mesma proporção, as células CD4+CD25+ de controles inibiram PBMC

autólogas em média 63,6% (23,3-135,9; dp = 43,2), e as dos pacientes com PF, 65,9% (37,5-104; dp=25,3), ($p=0,6$; Tabela 14). Ainda, entre os pacientes com PF, na razão de 1:5 ($n=4$), as células CD25⁺ inibiram PBMC autólogas em média de 73,4% (50,2-100; dp = 21,3) e, na mesma proporção, as células dos controles inibiram PBMC dos pacientes em 74,6% (55,4-104,4; dp = 21,1) ($p=0,87$). Na razão 1:5, controles inibiram PBMC autólogas em 75,4% (47,8-140; dp = 43,7), enquanto células de PF inibiram PBMC de controles em 74,6% (43,9-104,1; dp = 26,6), ($p=0,87$). Não houve diferença estatística na capacidade de supressão pelas Treg de pacientes com PF e controles, seja com PBMC autólogas ou co-cultivadas.

Tabela 14. Resultados de quantificação de CD25^{high} no sangue periférico, Titulação anti-Dsg e Inibição de proliferação celular pelas Treg nos pacientes com pêfigo

Paciente	Idade ^a	Sexo ^b	Tempo de evolução (meses)	Tempo sem Tratamento (meses)	Fenótipo clínico ^c	Quantificação CD25 ^{high} SP ^d	Dsg-Titulação (U/ml)		%Inibição de Proliferação (IP) ^e Paciente/ Controle	Razão %IP Controle/ Paciente ^f
Pacientes com PF (n=8)										
PF1	52	M	60	29	L	0,69	412,4	neg	n.r	n.r
PF2	24	M	12	na	D	0,91	174,2	neg	n.r	n.r
PF3	33	M	17	2	D	0,7	82,8	neg	n.r	n.r
PF4	57	F	288	3	L	1,67	173,8	neg	63,7 / 61,1	0,95
PF5	59	M	228	216	D	n.r	n.r	n.r.	41,3 / 51,8	1,25
PF6	18	M	4	na	D	1,11	188	neg	81 / 75,1	0,92
PF7	35	F	60	7	D	1,22	n.r	n.r.	104,1 / 104	0,99
PF8	32	F	15	na	D	n.r	178,2	neg	42,36 / 37,5	0,88
Pacientes com PV (n=7)										
PV1	49	M	12	na	D	1,35	21,4	37,8	n.r	n.r
PV2	36	M	5	na	D	0,75	22,5	127,6	33,52 / 50	1,49
PV3	53	M	27	5	L	1	nr	nr	37,93 / 48,8	1,28
PV4	73	F	6	na	L	1,04	nr	nr	71,81 / 77,4	1,07
PV5	62	F	18	3	L	1	107	neg	83,54 / 98,1	1,17
PV6	50	M	46	26	L	n.r	30,1	141,2	46,44 / 67,5	1,45
PV7	28	M	3	na	L	0,9	neg	169,9	n.r	n.r

a. Idade em anos completos; b. M, masculino; F, feminino; c. Fenótipos clínicos: Forma localizada (L) ou disseminada (D). PV localizado: acometimento exclusivamente mucoso ou de couro cabeludo. No PF, formas localizadas são restritas ao tronco superior, face e dorso superior; d. Percentual de células CD4+CD25^{high} em relação às PBMC do sangue periférico; e. Percentual de inibição de proliferação nos poços contendo PBMC de pacientes com pêfigo, anti-CD3 e células CD25+ (1:10) dos pacientes ou controles, em relação aos poços contendo PBMC, anti-CD3 e células CD25-; f. Razão de inibição de proliferação pelas células CD25+ de pacientes em relação às dos controles; na, não se aplica, pois paciente é virgem de tratamento; n.r, não realizado; neg., negativo.

5. Hematoxilina-eosina (H&E)

À coloração H&E, a presença de acantólise e de células acantolíticas foi confirmada nas 4 biópsias de lesão de pele de pacientes com PF, e nas duas amostras de pele de pacientes com PV. A coloração com H&E permitiu ainda analisar o infiltrado inflamatório presente na epiderme ou derme. Os achados estão descritos na Tabela 15.

6. Imunohistoquímica

A análise microscópica da marcação imunohistoquímica para Foxp3 revelou a presença de infiltrado de células imunomarcadas, preferencialmente distribuídas ao longo da derme papilar, e raramente na derme reticular. A distribuição foi semelhante nas 6 amostras (4 PF e 2 PV). Já as amostras de biópsia perilesional dos pacientes com pênfigo apresentaram imunomarcação para Foxp3 escassa ou ausente (Tabela 15, Figura 12).

Tabela 15. Descrição do infiltrado inflamatório ao H&E e marcação imunohistoquímica de Foxp3 nas lesões de pêfigo e amostras perilesionais

Paciente	Infiltrado inflamatório (H&E) – lesão de pêfigo	Infiltrado inflamatório (H&E) – perilesional	IHQ lesão	IHQ Perilesional
PF2	Epiderme: presença de paraceratose, vesículas espongíóticas antigas e acúmulo focal de neutrófilos. Derme apresenta infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular muito discreto e superficial.	Não tem amostra	Presença de células com marcação Foxp3+ na derme superior, além de raras células Foxp3+ na epiderme.	Não tem amostra
PF6	Epiderme: Foco de destacamento parcial da epiderme, em posição da camada espinhosa, com algumas células acantolíticas, sem infiltrado inflamatório evidente. Derme: Presença de inflamação linfohistiocitária na derme superior.	Infiltrado inflamatório leve, linfohistiocitário, na derme papilar.	Não se observa marcação para Foxp3 em focos. Presença de células escassas Foxp3+ na derme papilar.	Ausência de marcação para Foxp3+ na amostra.
PF7	Epiderme: espongiose moderada; exocitose de polimorfonucleares. Derme papilar: edema, poucos melanófagos e moderado processo inflamatório linfoplasmocitário, com alguns eosinófilos, predominantemente perivascular. A derme reticular apresenta infiltrado inflamatório semelhante.	Infiltrado inflamatório leve, linfohistiocitário, na derme papilar.	Presença de numerosas células Foxp3+ na derme papilar, formando numerosos focos de positividade. Raras células positivas na derme reticular.	Ausência de marcação para Foxp3+ na amostra.
PF8	Epiderme: foco de paraceratose com pequeno aglomerado de neutrófilos, espongiose leve, exocitose focal de linfócitos e degeneração vacuolar focal da camada basal. Derme superficial: leve infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário, em torno de vasos.	Infiltrado inflamatório leve, linfohistioplasmocitário, na derme papilar	Ausência de marcação para Foxp3 na epiderme; presença de raras células Foxp3+ na derme papilar.	Presença de raras células Foxp3+ na derme papilar
PV5	Presença de infiltrado inflamatório moderado, composto por histiócitos e linfócitos, estendendo-se da derme papilar até a derme reticular.	Presença de infiltrado inflamatório linfohistiocitário, na derme papilar.	Presença de numerosas células Foxp3+ na derme papilar, caracterizando como focos.	Presença de raras células Foxp3+ na derme papilar.
PV6	Epiderme: fendas e vesículas entre a camada basal e a camada espinhosa, contendo em seu interior células acantolíticas e alguns polimorfonucleares. Discreta exocitose de polimorfonucleares. A derme superficial apresenta leve edema intersticial e moderado infiltrado inflamatório misto intersticial e perivascular.	A derme superficial apresenta moderado infiltrado inflamatório misto intersticial e perivascular.	Positividade para Foxp3, com raras células marcadas, na derme papilar.	Ausência de marcação para Foxp3+ na amostra.

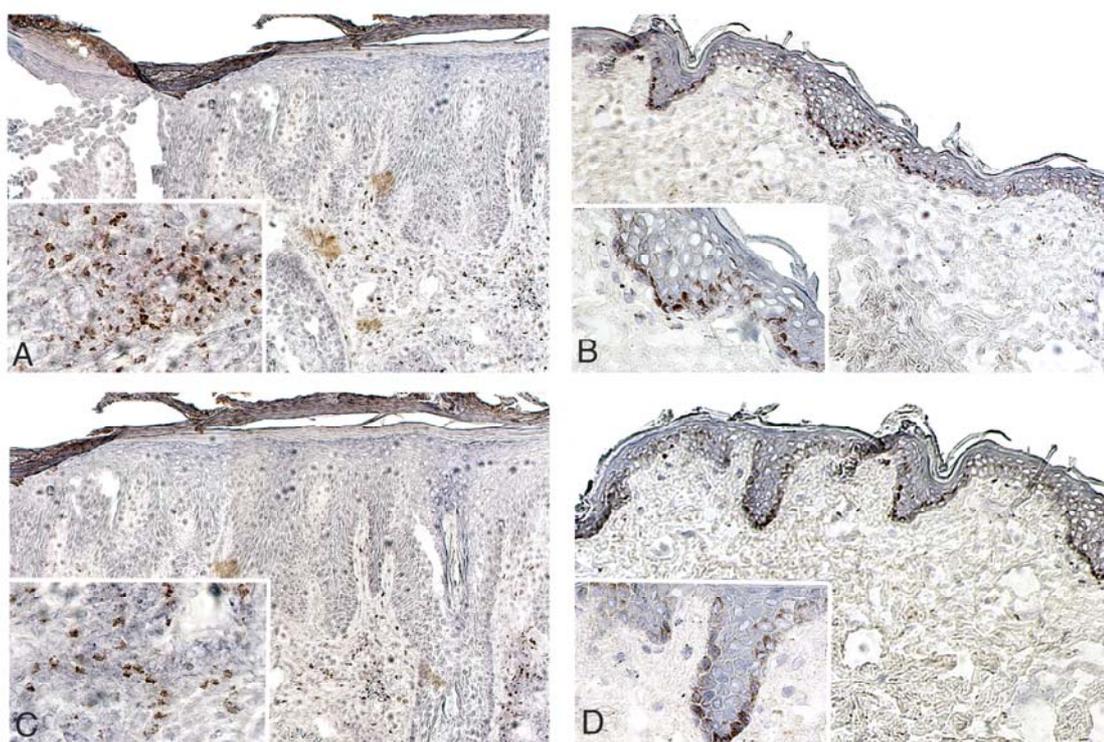


Figura 12. Marcação imunohistoquímica para Foxp3 em amostra de pele de pacientes com pênfigo vulgar (A,B) (paciente PV5), e com pênfigo foliáceo (C,D) (paciente PF8, Tabela 15). A e C representam lesões em atividade, e B e D, amostras perilesionais. Nas lesões em atividade (A, C), as células com marcação para Foxp3 estão preferencialmente distribuídas na derme superficial (10x, inserto 40x). Na amostra perilesional (B,D) as células com marcação Foxp3+ são escassas ou ausentes (10x; inserto 40x).

7. Microscopia Confocal

Realizou-se marcação e captura de imagens de microscopia confocal em amostras de pele de lesão de pênfigo em atividade de 4 pacientes (3 PF; 1 PV).

A microscopia confocal permitiu confirmar a presença de células Treg CD4+CD25+ nas lesões de pênfigo, complementando a marcação para Foxp3 observada na imunohistoquímica. Observou-se a dupla marcação CD4+ e CD25+ nas células das lesões de PV e de PF (Figuras 13 e 14).

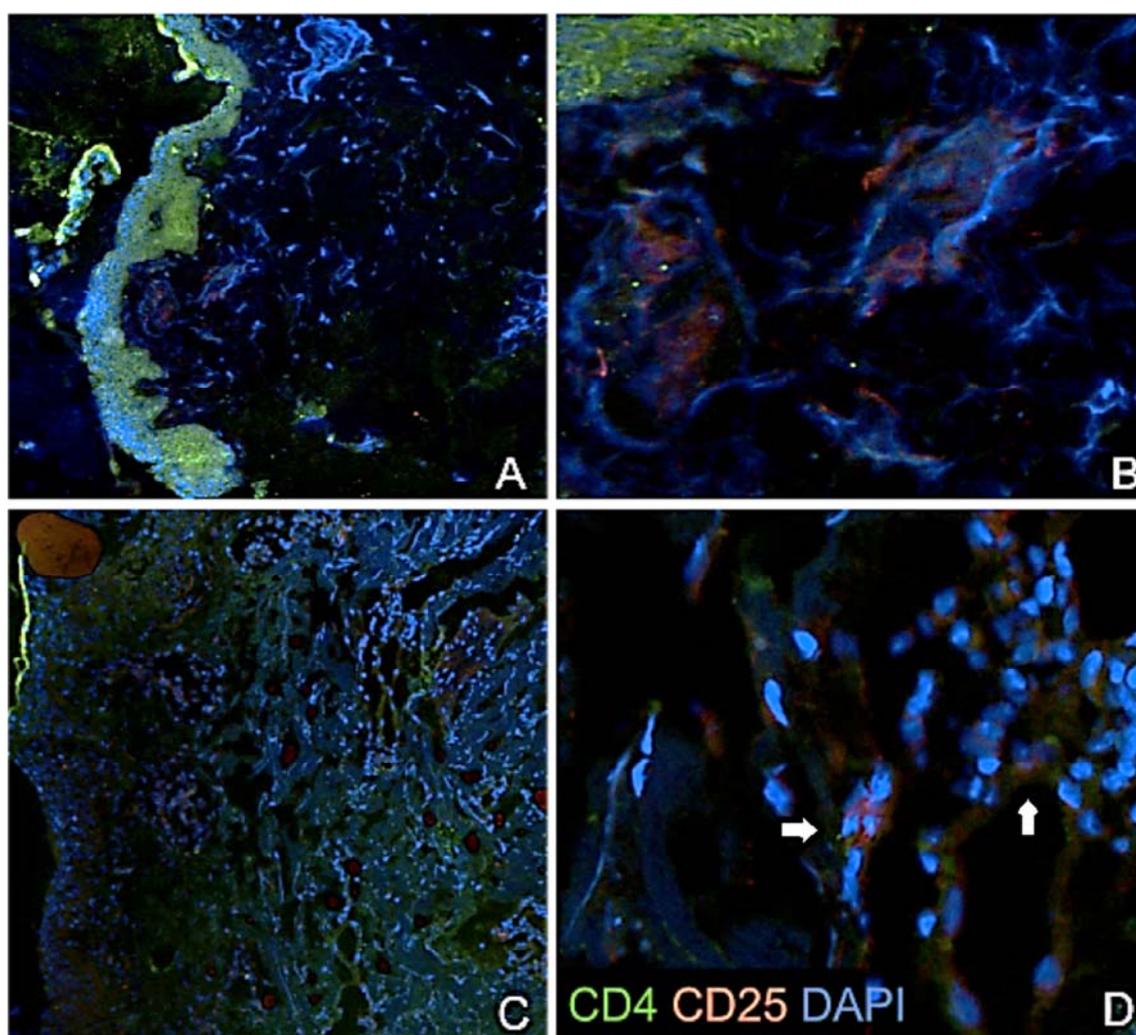


Figura 13. Microscopia confocal mostrando dupla marcação por imunofluorescência para CD4 (Alexa 488 – verde) e CD25 (Alexa 647- vermelho) em duas amostras de pele de pacientes com pênfigo foliáceo (pacientes PF6 e PF7). Diamino-2-phenylindole (DAPI) foi usado para marcação de material genético nuclear (azul). A e C mostram aumento original-20x. B e D: imagens com magnificação 20x e zoom 5x, demonstrando células com dupla marcação CD4+CD25+ (Treg). Na figura D, a dupla marcação é mais bem observada.

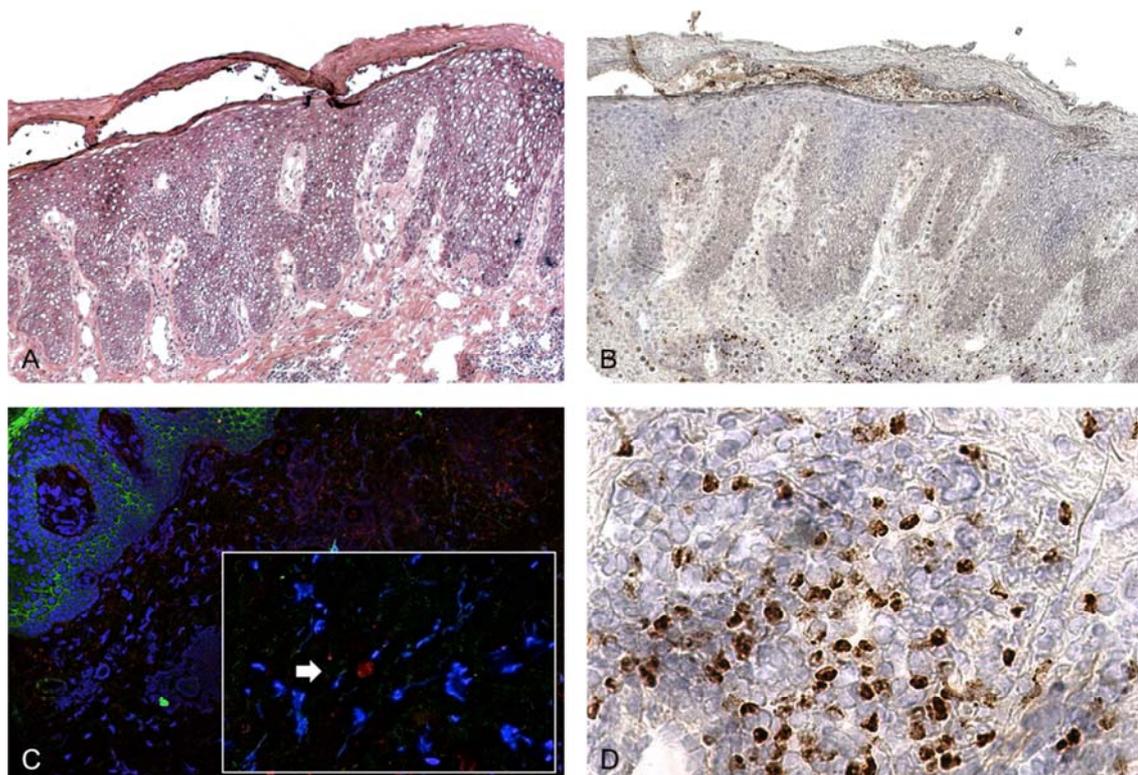


Figura 14. Coloração com H&E (A), imunohistoquímica (B, D) e microscopia confocal (C) de amostra de biópsia de pele de paciente com diagnóstico de pêmfigo foliáceo (PF7) (PF7, Tabela 15). **A:** Coloração com H&E evidencia acantólise subcórnea, além de exocitose de polimorfonucleares na epiderme. Na derme, observa-se moderado processo inflamatório linfocitário, B e D: Marcação imunohistoquímica para Foxp3. Presença de numerosas células Foxp3+ na derme papilar, e perivascular, formando diversos focos de positividade. Em D, infiltrado Foxp3+ na derme papilar (aumento 10x, 40x). C: Microscopia confocal mostrando dupla marcação por imunofluorescência para CD4 (Alexa 488 – verde) e CD25 (Alexa 647- vermelho). Diamino-2-phenylindole (DAPI) foi usado para marcação de material genético nuclear (azul). Imagem com magnificação 20x e inserto com zoom 5x. Seta indica dupla marcação CD4+CD25+ (Treg).

6. Discussão

Nesse estudo visamos caracterizar as células Treg CD4+CD25+ no sangue periférico e na pele de pacientes com PV e PF, correlacionando os achados com a tipagem alélica HLA – DQ e –DR, com a hipótese de que a redução em número ou função das células Treg no sangue periférico ou nas lesões de pênfigo poderia estar envolvida na quebra de tolerância imunológica nessa dermatose bolhosa.

Pênfigos são modelos de doenças autoimunes bolhosas, e a caracterização das células Treg no PV e PF é importante para o conhecimento do envolvimento dos linfócitos T na produção de autoanticorpos e na quebra da autotolerância na sua patogênese. A revisão bibliográfica mostra que esse é o primeiro estudo envolvendo a análise da função das células Treg nos pênfigos.

Observou-se redução significativa da frequência das células CD4+CD25^{high} em relação às PBMC do sangue periférico tanto em pacientes com PV quanto com PF comparados aos controles. Esse resultado em grupo de pacientes com PF ainda não é descrito na literatura. Todos os pacientes incluídos nesse estudo encontravam-se sem uso de tratamentos imunossupressores por no mínimo 60 dias no momento da coleta, de forma a não haver interferência dessas medicações nos resultados encontrados, e apresentavam-se com doença em atividade, a maioria confirmada também por dosagem dos autoanticorpos circulantes anti-Dsg.

O critério de ausência de tratamento imunossupressor no recrutamento dos pacientes com pênfigo foi um fator limitante deste estudo, uma vez que esse projeto foi desenvolvido em hospital de referência, onde a maioria dos casos encaminhados comparece em uso de terapia imunossupressora no momento da admissão no ambulatório de Dermatologia, dificultando a inclusão de um número maior de pacientes nesse estudo. Consideramos, no entanto, que esse é um fator importante na credibilidade e reprodutibilidade dos achados dessa pesquisa.

Sugiyama et al. (2007) descreveram redução pronunciada das células Treg nos pacientes com PV, 10 vezes menor que nos controles. Esse achado não foi confirmado pelos autores no grupo PF. No estudo citado, 4/11 pacientes com PV estavam em remissão, e 6/11 pacientes encontravam-se em uso de medicação imunossupressora sistêmica (betametasona, ciclosporina A, ou prednisolona). Entre os pacientes com PF, todos encontravam-se em atividade, porém 2/5 pacientes encontravam-se em uso de imunossupressores sistêmicos, como os citados acima (Sugiyama et al, 2007).

Ao estratificarmos os pacientes por idade, não se observou diferença na frequência de células CD4+CD25^{high} entre pacientes com pêmfigo com idade menor ou maior que 50 anos, quando comparados aos controles. Embora haja discussão sobre a ocorrência ou não de declínio da função das Treg com a idade, esse viés foi considerado ao parearem-se os controles por idade nos ensaios de co-cultura (Somerset, 2004; Tsaknaridis, 2003, Prieto; Rosenstein, 2006).

Observou-se redução na expressão do marcador de superfície CCR4 entre as células CD4+CD25^{high} do sangue periférico dos pacientes com pêmfigo, quando comparada às dos controles (p=0,04). Esse dado chama a atenção, uma vez que o ligante do CCR4 - CCL17 - é constitutivamente expresso pelas células endoteliais das vênulas pós-capilares da derme, e foi demonstrado que o receptor de quimiocina CCR4 das Treg sofre um processo de *upregulation* ao se reconhecerem antígenos nos órgãos linfoides secundários, e direciona a migração das Tregs para a pele durante processos inflamatórios e autoimunes, onde atuariam modulando essas respostas. Na ausência do marcador CCR4, a migração das Treg para a pele é prejudicada (Sather et al., 2007). Como essa observação foi feita no sangue periférico, como hipótese, nos pacientes com pêmfigo essas células poderiam já ter migrado para sítios de lesão.

Não houve diferença significativa entre o número de células Treg no sangue periférico com a gravidade da doença (pacientes com as formas localizadas ou disseminadas de PV ou

PF), ou entre pacientes virgens de tratamento e pacientes submetidos a tratamento prévio com imunossupressores. Também não houve correlação forte entre o número de células Treg no sangue periférico e os níveis de autoanticorpos circulantes anti-Dsg, o tempo de evolução da doença ou o tempo sem uso de terapia imunossupressora – naqueles pacientes que já haviam usado tratamento prévio, não se aplicando aos pacientes virgens de tratamento.

O alelo HLA DRB1*01:02, frequente entre os pacientes com PF nesse estudo, foi descrito em dois trabalhos distintos como o mais frequente no PFE na população brasileira, tratando-se de um alelo de susceptibilidade e predispondo seus portadores ao PF (Pavoni et al., 2003; Petzel-Erler et al., 1989). Já a molécula DQA1* não apresenta dados na literatura atual, tendo sido observada nesse estudo a presença do alelo HLA DQA1*03:01 em 2 pacientes com PF, um deles em homozigose.

No PV, o HLA DRB1*14:02 foi frequente (o alelo *14 é descrito como de susceptibilidade em população brasileira), além do DQA1* (alelo de susceptibilidade em iranianos e paquistaneses, judeus não Ashkenasi, entre outros) e DQA1*03:01 (alelo de susceptibilidade nas populações japonesa e judaica) (Delgado et al., 1997; Miyagawa et al., 1997; Loiseau et al., 2000; Shams et al., 2009; Weber et al., 2011).

Glisic et al. (2009) observaram associação dos alelos HLA DQB1*03:02, *02:01 e *06:02 com apoptose de células Treg em pacientes com diabetes tipo I. O alelo HLA DQB1*03:02 também confere susceptibilidade para ambos os pênfigos, PV e PF (Loiseau et al., 2000; Saha et al., 2010; Pavoni et al., 2003), e foi identificado em 3 pacientes desse estudo: PV1, PV3 e PF5. Dois desses pacientes tiveram as células Treg quantificadas no sangue periférico (PV1 e PV3) e, em dois deles, sua função analisada em ensaio de proliferação (PV3 e PF5). Na análise desse grupo, não foi possível observar tendência à acentuação da redução de Treg no sangue periférico ou diferença na inibição de proliferação pelas Treg desses pacientes nos ensaios de proliferação (Figura 9, Tabela 15).

Os ensaios de co-cultura representam importante ferramenta de análise da função da capacidade supressora das células Treg, ao inibir a proliferação celular (Thornton, Shevach, 1998). Anticorpos anti-CD3 promovem um estímulo proliferativo via receptor de células T (TCR) (Li e Kurlander, 2010), e ao adicioná-lo a placas de cultivo com PBMC dos pacientes e controles, com a Treg dos próprios indivíduos ou em co-cultivo, observa-se a capacidade dessas células em inibir a proliferação.

Isolaram-se cuidadosamente as células CD4+CD25+ por FACS para posterior cultivo nas placas de cultura. As células CD4+CD25+ do grupo de pacientes com PV, PF e de controles inibiram a proliferação celular dos linfócitos do PBMC, em resposta ao estímulo com anti-CD3 (Figura 11) não havendo diferença significativa na capacidade supressora das Treg de pacientes ou controles, seja na proporção de 1 célula CD25+ para cada 10 PBMC ou 1 célula CD25+ para 5 PBMC (Figura 10).

Esse achado levanta algumas questões interessantes acerca da redução periférica nas células Treg de pacientes com pênfigo: o número reduzido de Treg, mas com função preservada, é suficiente para modular respostas inflamatórias e inibir células T autorreativas? As células Treg estariam reduzidas em número por possível recrutamento para os sítios de lesão?

Permanece incerto se a redução em número de células Treg nos pênfigos seria suficiente para permitir a apresentação de autoantígenos pelos linfócitos T CD4 aos linfócitos B, e conseqüente produção de autoanticorpos pelos linfócitos B, ou se essa redução no número de Treg seria conseqüência da doença autoimune.

As células Treg necessitam migrar para os órgãos periféricos para promover a regulação efetiva da inflamação. (Chow et al., 2013; Siegmund et al., 2005; Yurchenko et al., 2006). Arakawa et al. (2009) realizaram estudo imunohistoquímico com imunomarcagem para Foxp3 (avaliação quantitativa Foxp3/CD4+) em biópsias de lesões de pele de 11 pacientes

com PV e 7 com PF, sem coleta de amostra perilesional, e, como controle, utilizaram biópsia de pele de indivíduo saudável. Observou-se nesse estudo que os grupos PF e PV expressaram imunomarcagem positiva para Foxp3 nas amostras de pele, que foi indetectável no controle. A imunomarcagem para Foxp3 foi semelhante entre os dois tipos de pênfigo, apesar da presença de infiltrado inflamatório mais pronunciado no PV. Não foi observada correlação entre porcentagem de células Foxp3+ e a gravidade da doença, ou títulos de anti-Dsg (Arakawa et al., 2009).

Em outro estudo, Terras et al. (2013) analisaram biópsias de lesões de 6 pacientes com PV, com marcação de Foxp3 por imunohistoquímica (quantificação Foxp3/CD3+), e 16 amostras de pele de controles saudáveis, sem amostras perilesionais. Os autores observaram infiltrado inflamatório acentuado nas amostras de PV, com mediana de células Foxp3+ em relação às CD3+ pouco maior que na pele saudável, porém sem significância estatística (Terras et al., 2013).

Lago (2011) analisou, por IHQ, amostras de pele 22 pacientes com PFE e 10 controles saudáveis, com quantificação de Foxp3+, CD4+, CD25+, CD4+Foxp3+ e CD25+Foxp3+. Observou-se naquele estudo, presença de infiltrado epidérmico aumentado de linfócitos imunomarcados CD25+ ($p=0,003$), Foxp3+ ($p=0,04$) e CD25+Foxp3+ ($p=0,007$) nas amostras de PFE comparadas às dos controles, bem como infiltrado dérmico exibindo uma maior expressão de linfócitos CD4+ ($p<0,001$) e CD25+ ($p=0,008$) (Lago, 2011).

Visando contribuir no esclarecimento dessas questões e caracterizar a distribuição preferencial das células Treg nas lesões de pacientes com PV e PF, comparadas à pele perilesional (biópsias de pele aparentemente sã, coletadas a 2 cm da lesão analisada), avaliou-se as amostras de biópsia por IHQ e microscopia confocal.

A distribuição das células Foxp3+ nas lesões de PV e PF foi semelhante nas 6 amostras (4 PF e 2 PV), localizadas na derme superior, em focos de marcação Foxp3+. As

amostras perilesionais apresentaram imunomarcagem para Foxp3 escassa ou ausente, apesar do infiltrado inflamatório observado ao H&E. Esses achados nos permitem inferir que as células Foxp3+, observadas nas lesões, foram recrutadas após a acantólise, e sugerir que as células Treg estariam direcionando-se preferencialmente para os sítios de lesão, onde poderiam exercer papel regulador da resposta imunopatológica local.

As células Foxp3+ observadas na lesão do pênfigo podem corresponder a células Treg naturais, ou tratar-se de células Treg induzidas (iTreg, Th3) – geradas a partir dos linfócitos T *naive* na periferia, que produzem TGF-beta e IL-10, e expressam Foxp3, desenvolvendo resposta aos antígenos externos. Não foi objetivo de esse estudo quantificar as células CD4+CD25+ ou Foxp3+ nas amostras de pele, mas caracterizar a distribuição dessas células, que esteve presente preferencialmente na derme superior, e não na fenda epidérmica. Para responder a esses questionamentos, verificaremos se as células Treg, presentes na pele, mantêm a sua funcionalidade, pela expressão de IL-10 e de TGF-beta (experimentos em andamento).

O presente estudo representa contribuição na elucidação do papel das células Treg na fisiopatologia da autoimunidade do pênfigo vulgar e do pênfigo foliáceo. Pesquisas adicionais são importantes e necessárias para melhor caracterizá-lo, com análise de um número maior de pacientes em ensaios de cultura, bem como de biópsias de lesões de pênfigo para imunohistoquímica com identificação e quantificação das Treg nos sítios de lesão. Sugerimos ainda estudos posteriores visando identificar associação entre o HLA DQB1*0302 e a redução ou apoptose de Treg.

7. Conclusões

1. Células T CD4+CD25^{high} encontram-se diminuídas em relação ao total de PBMC no sangue periférico de pacientes com pênfigo foliáceo e com pênfigo vulgar, quando comparados aos controles saudáveis.
2. Houve menor expressão de CCR4 entre as células CD4+CD25^{high} nos pênfigos, quando comparadas às dos controles. Não se observou diferença na expressão de CTLA4 entre as células CD4+CD25^{high} de pacientes e controles.
3. Células T CD4+CD25+ do sangue periférico de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar suprimem a proliferação celular de PBMC autólogos de forma semelhante à supressão das células T CD4+CD25+ dos controles saudáveis.
4. Células T CD4+CD25+ do sangue periférico de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar suprimem a proliferação celular de PBMC de controles sadios de forma semelhante à supressão das células T CD4+CD25+ dos controles saudáveis.
5. Células Treg, marcadas por Foxp3 por imunohistoquímica e à microscopia confocal, por dupla marcação CD4+ e CD25+, estiveram presentes preferencialmente na derme superior nas biópsias de pele de pênfigo. Amostras perilesionais apresentaram imunomarcação para Foxp3 escassa ou ausente.
6. Não houve correlação entre o alelo HLA DQB1*03:02 – descrito como fator apoptótico de células Treg no diabetes e também de susceptibilidade nos pênfigos – e a quantificação ou função de células Treg no pênfigo.

8. Referências Bibliográficas

Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew; Pillai, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Abida O, Zitouni M, Kallel-Sellami M, Mahfoudh N, Kammoun A, Ben Ayed M, Masmoudi A, Mokni M, Fezzaa B, Ben Osman A, Kammoun MR, Turki H, Makni H, Gilbert D, Joly P, Tron F, Makni S, Masmoudi H. Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with the HLA-DR 3 gene: anti-desmoglein 1 antibody-positive healthy subjects bear protective alleles. **Br J Dermatol**. 2009;161:522–527.

Abréu-Vélez AM, Reason IJM, Howard MS, Roselino AM. Endemic pemphigus foliaceus over a century: Part I. **N Am J Med Sci**. 2010; February; 2(2): 51–59.

Abréu-Vélez AM, Roselino AM, Howard MS, Reason IJ. Endemic pemphigus over a century: Part II. **N Am J Med Sci**. 2010 Mar;2(3):114-25.

Ahmed AR, Wagner R, Khatri K et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1991; Jun 1;88: 5056–5060.

Aires JM, Chociay MF, Nascimento MMP, Figueiredo JFC, Roselino AM. Maxadilan (MAX) – salivary protein of *Lutzomyia longipalpis*: detection of antibodies anti-MAX in American tegumentary leishmaniasis (ATL), and genetic expression of MAX in *Lu. neivai*. **An Bras Dermatol**. 2005; 80:S333-S338.

Alecu M, Ursaciuc Cm Surcek M, Coman G, Ciotaru D, Dobre M. CD28 T-cell costimulatory molecule expression in pemphigus vulgaris. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 2009; Mar;23(3):288-91.

Alunno A, Nocentini G, Bistoni O, Petrillo MG, Bartoloni Bocci E, Ronchetti S, Lo Vaglio E, Riccardi C, Gerli R. Expansion of CD4+CD25-GITR+ regulatory T-cell subset in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome: correlation with disease activity. **Reumatismo**. 2012 Dec 11;64(5):293-8.

Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, Nocentini G, Ronchetti S, Caterbi S, Valentini V, Riccardi C, Gerli R. Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. **Clin Dev Immunol**. 2012;2012:823085.

Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. **N Engl J Med**. 1982;306(20):1189–1196.

Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. **Eur J Immunol**. 1999;29(7):2233–2240.

Arakawa M, Dainichi T, Yasumoto S, Hashimoto T. Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **J Dermatol Sci**. 2009 Mar;53(3):228-31.

Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Tsuruta D, Hashimoto T. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. **Exp Dermatol**. 2011 Dec;20(12):1022-4.

Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. **Ann Rheum Dis** 2010;69:822-7.

Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **J Exp Med**. 1996;184:387-396.

Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. **Autoimmun Rev**. 2005 Nov;4(8):491-6. Review.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25+ regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**. 2001; 167:1245-53.

Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. **J Immunol**. 2006;176:4622-4631.

Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. **Immunol Rev**. 2006;212:203-216.

Barraviera SR, Dillon NL, Rezkallah-Iwasso MT, Peracoli TS, Curi PR, de Almeida DB. Cell and Humoral Immunity in endemic pemphigus foliaceus. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo. 1995;37:25-33.

Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A Paradigm of Immunodeficiency with Autoimmunity. **Front Immunol**. 2012; 3:211.

Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006;103(34):12855-12860.

Berkowitz P, Chua M, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. **Am J Pathol**. 2008;173(6):1628-1636.

Bordel-Gomez MT, Sánchez-Estella J, Yuste-Chaves Y, Santos-Durán JC, Alonso-San Pablo MT. Pénfigo vulgar familiar: estudio inmunogenético de los antígenos HLA clase II. **Actas Dermosifiliogr.** 2006;97:509-13.

Caldelari R, De Bruin A, Baumann D, et al. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. **J Cell Biol.** 2001;153(4):823–834.

Cerna M, Fernandez-Vina M, Friedman H, et al. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) in Xavante Indians. **Tissue Antigens.** 1993;42:138-40.

Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Esmaili N, Balighi K, Hallaji Z, Barzegari M, Akhiani M, Ghodsi Z, Mortazavi H, Naraghi Z. Pemphigus: analysis of 1209 cases. **Int J Dermatol.** 2005 Jun;44(6):470-6.

Chanussot-Deprez C, Vega-Memije ME, Mosqueda-Taylor A, et al. Pénfigo vulgar en una niña de 14 años. **Med Cut Iber Lat Am.** 2007;35:285-9.

Chernyavsky AI, Arredondo J, Kitajima Y, Sato-Nagai M, Grando SA. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. **J Biol Chem.** 2007;282(18):13804– 13812.

Chiossi MP, Roselino AM. Endemic Pemphigus foliaceus (“Fogo selvagem”): a series from the Northeastern region of the State of Sao Paulo, Brazil, 1973-1998. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2001;43:59-62.

Chiossi MP, Costa RS, Roselino AM. Dermal dendritic cell number correlates with serum autoantibody titers in Brazilian pemphigus foliaceus patients. **Braz J Med Biol Res.** 2004;37:337-41.

Chrigrer RS, Roselino AM, de Castro M. Glucocorticoid sensitivity and proinflammatory cytokines pattern in pemphigus. **J Clin Immunol.** 2012 Aug;32(4):786-93.

Civatte A. Diagnostic histopathologique de la dermatite polymorphe douloureuse ou maladie de Duhring-Brocq. **Ann Dermatol Syph.** 1943; 3:1–30.

Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. **J Invest Dermatol.** 2010 Feb;130(2):362-70. doi: 10.1038/jid.2009.247.

Coenen JJA, Koenen HJPM, Van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten, I. Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. **Blood.** 2006; 107: 1018-1023

Corse E, Gottschalk RA, Park JS, Sepulveda MA, Loke P, Sullivan TJ, Johnson LK, Allison JP. Cutting edge: chronic inflammatory liver disease in mice expressing a CD28-specific ligand. **J Immunol**. 2013 Jan 15;190(2):526-30.

Costa DL, Guimarães LH, Cardoso TM, Queiroz A, Lago E, Roselino AM, Bacellar O, Carvalho EM, Silva JS. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. **Hum Immunol**. 2013 Dec;74(12):1491-500.

Culton DA, Qian Y, Li N, Rubenstein D, Aoki V, Hans Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: A paradigm of human autoimmunity. **J Autoimmun**. 2008;31:311-24.

de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, et al. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. **J Histochem Cytochem**. 2007 Sep;55(9):891-8.

Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AI, Rehman SB, Khan AA, Ahmad M, Alper CA, Ahmed AR, Yunis EJ. Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. **Hum Immunol**. 1997 Oct;57(2):110-9.

Delva E, Jennings JM, Calkins CC, Kottke MD, Faundez V, Kowalczyk AP. Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. **J Biol Chem**. 2008;283(26):18303–18313.

Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. **J Am Acad Dermatol**. 1989;20:657–669.

Diaz LA, Prisyanyh PS, Dasher DA, et al. The IgM Anti-Desmoglein 1 Response Distinguishes Brazilian Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) from Other Forms of Pemphigus. **J Invest Dermatol**. 2008;128:667–75.

Femiano F. Pemphigus vulgaris: recent advances in our understanding of its pathogenesis. **Minerva Stomatol**. 2007;56:215-23.

Fiorentino DF, Garcia MS, Rehmus W, Kimball AB. A Pilot Study of Etanercept Treatment for Pemphigus Vulgaris. **Arch Dermatol**. 2010;147(1):117-118.

Flores G, Culton DA, Prisyanyh P, Qaqish BF, et al. IgG autoantibody response against keratinocyte cadherins in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol**. 2012 Nov;132(11):2573-80.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**. 2003 Apr;4(4):330-6.

Gogishvili T, Lühder F, Goebbels S, Beer-Hammer S, Pfeffer K, Hünig T. Cell-intrinsic and extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. **Eur J Immunol**. 2013 Jan;43(1):188-93.

García-Rabasco A, Alsina-Gibert M, Pau-Charles I, Iranzo P. Infliximab therapy failure in two patients with pemphigus vulgaris. **J Am Acad Dermatol**. 2012 Nov;67(5):e196-7.

Girvin AM, Dal Canto MC, Rhee L, Salomon B, Sharpe A, Bluestone JA, Miller SD. A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. **J Immunol**. 2000 Jan 1;164(1):136-43.

Glisic S, Klinker M, Waukau J, Jailwala P, Jana S, Basken J, Wang T, Alemzadeh R, Hagopian W, Ghosh S. Genetic association of HLA DQB1 with CD4+CD25+(high) T-cell apoptosis in type 1 diabetes. **Genes Immun**. 2009 Jun;10(4):334-40.

Glorio R, Rodriguez Costa G, Haas R, Gruber M, Fainboim L, Woscoff A. HLA haplotypes and class II molecular alleles in Argentinian patients with pemphigus vulgaris. **J Cutan Med Surg**. 2002 Sep-Oct;6(5):422-6. Epub 2002 Aug 29.

Gonçalves GA, Brito MM, Salathiel AM, Ferraz TS, Alves D, Roselino AM. Incidence of pemphigus vulgaris exceeds that of pemphigus foliaceus in a region where pemphigus foliaceus is endemic: analysis of a 21-year historical series. **An Bras Dermatol**. 2011 Nov-Dec;86(6):1109-12.

Grando SA. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on keratinocyte functions. **Handb Exp Pharmacol**. 2012;(208):429-50. Review.

Hemminki K, Li X, Sundquist J, Hillert J and Sundquist K. Risk for multiple sclerosis in relatives and spouses of patients diagnosed with autoimmune and related conditions. **Neurogenetics** 2009;10:5-11.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**. 2003; 299:1057-61.

Hu S, Tao D, He P. Expression of costimulatory molecules B7/CD28 in systemic lupus erythematosus. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**. 2004;24(3):245-6, 265.

Iellem A, Mariani M, Lang R *et al*. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **J Exp Med**. 2001; **194**: 847–53.

Ji L, Zhan Y, Hua F, Li F, Zou S, Wang W, Song D, Min Z, Chen H, Cheng Y. The ratio of treg/th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia. **PLoS One**. 2012;7(12):e50909.

Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. **N Engl J Med**. 2006 Mar 16;354(11):1166-76.

Jolly PS, Berkowitz P, Bektas M, Lee HE, Chua M, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. **J Biol Chem**. 2010 Mar 19;285(12):8936-41.

Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. **Cell**. 1987 Apr 24;49(2):273–280.

Kawasaki Y, Aoyama Y, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Pathogenic monoclonal antibody against desmoglein 3 augments desmoglein 3 and p38 MAPK phosphorylation in human squamous carcinoma cell line. **Autoimmunity**. 2006;39(7):587–590.

Kim OM, Pepinelli M, Passeri M, Figueiredo JFC, Roselino AM. Soro de pacientes com pênfigo foliáceo (fogo selvagem) reage contra proteínas salivares de inseto hematófago. **An Bras Dermatol**. 2008;83:S30.

Kim OM. **Papel da saliva de insetos hematófagos na fisiopatologia do Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem-FS)**. 2012. 187 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Ribeirão Preto, São Paulo. 2012.

Klein J, Sato A. “The HLA system. First of two parts”. **N Engl J Med**. 2000;343(10): 702-9.

Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. **J Exp Med**. 2004 May 3;199(9):1285-91.

Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. **J Immunol**. 2007;178:6730–6733.

Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood**. 2009;114:1141–1149.

Kupper TS, Fuhlbrigge. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat Rev Immunol**. 2012; 4:211–22.

Kupper TS. Old and new: recent innovations in vaccine biology and skin T cells. **J Invest Dermatol**. 2012 Mar;132(3 Pt 2):829-34.

Lago, F. **Perfil imunistoquímico de linfócitos T regulatórios no pêfingo foliáceo endêmico através da expressão do marcador Foxp3**. 2011. 87 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia. São Paulo, 2011.

Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris incidence and mortality in UK: population based cohort study. **BMJ**. 2008, Jul9;337:a180.

Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. **Arthritis Rheum**. 2010;62:2876–2885.

Lever WF (1965). **"Pemphigus and Pemphigoid**. Springfield, IL: Charles C. Thomas.

Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. **J Transl Med**. 2010 Oct 26;8:104.

Li N, Zhao M, Wang J, Liu Z, Diaz LA. Involvement of the apoptotic mechanism in pemphigus foliaceus autoimmune injury of the skin. **J Immunol**. 2009;182(1):711–717.

Lin MS, Fu CL, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Moraes JR, Moraes ME, Lazaro AM, Giudice GJ, Stastny P, Diaz LA. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Clin Invest**. 2000 Jan;105(2):207-13.

Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**. 2005 Jan;54(1):92-9.

Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S, et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **J Autoimmun**. 2000;15:67-73.

Lombardi ML, Mercurio O, Tecame G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, Pirozzi G, Manzo C. Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. **Tissue Antigens**. 1996 Mar;47(3):228-30. PubMed PMID: 8740773.

Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, et al. Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. **J Invest Dermatol.** 1999;113:107-10.

Martel P, Gilbert D, Busson M, Loiseau P, Lepage V, Drouot L, et al. Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. **Genes Immun.** 2002;3:205-10.

Miroux C, Morales O, Ouaguia L, Aoudjehane L, Boleslawski E, Pancré V, de Launoit Y, Calmus Y, Conti F, Delhem N. Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil. **Transplant Proc.** 2012 Nov;44(9):2834-9.

Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, de Launoit Y, Pancré V, Conti F, Delhem N. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. **Transplantation.** 2012 Jul 27;94(2):123-31

Miyagawa S, Higashimine I, Iida T, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese. **J Invest Dermatol.** 1997;109:615-8.

Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. T(REG)-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol.** 2014 Jul 1. doi: 10.1038/nrrheum.2014.105.

Moraes JR, Moraes ME, Fernandez-Vina M, Diaz LA, Friedman H, Campbell IT, et al. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics.** 1991;33:388-91.

Moraes ME, Fernandez-Vina M, Lazaro A, et al. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens.** 1997;49:35-40.

Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. **J Exp Med.** 2005;202:135-43.

Niizeki H, Inoko H, Narimatsu H et al. HLA class II antigens are associated with Japanese pemphigus patients. **Hum Immunol.** 1991; 31: 246-250.

Niizeki H, Inoko H, Mizuki N et al. HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method. **Tissue Antigens.** 1994; 44: 248-251.

Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T. Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. **J Invest Dermatol.** 2000 Jan;114(1):88-94

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Curr Opin Immunol.** 2014 Apr;27:1-7.

Nousari HC, Anhalt GJ. Pemphigus and bullous pemphigoid. **Lancet.** 1999 Aug 21;354(9179):667-72. Review.

Osada K, Seishima M, Kitajima Y. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 1997;108(4):482-487.

Pacheco-Tovar MG, Avalos-Díaz E, Vega-Memije E, et al. The final destiny of acantholytic cells in pemphigus is Fas mediated. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2009;23(6):697-701.

Pastille E, Bardini K, Fleissner D, Adamczyk A, Frede A, Wadwa M, von Smolinski D, Kasper S, Sparwasser T, Gruber AD, Schuler M, Sakaguchi S, Roers A, Müller W, Hansen W, Buer J, Westendorf AM. Transient Ablation of Regulatory T cells Improves Antitumor Immunity in Colitis-Associated Colon Cancer. **Cancer Res.** 2014 Jun 6.

Pavoni DP, Roxo VM, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes Immun.** 2003;4:110-6.

Pedroza-Gonzales A, Verhoef C, Ijzermans JN, Peppelenbosch MP, Kwakkeboom J, Verheij J, Janssen HL, Sprengers D. Activated tumor-infiltrating CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer. **Hepatology.** 2013 Jan;57(1):183-94.

Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, Wang Y, Walunas T, Bluestone J, Listman J, Finn PW. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. **J Immunol.** 1996 Jun 1;156(11):4154-9.

Peterson RA. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. **Toxicol Pathol.** 2012;40(2):186-204.

Petzl-Erler ML, Santamaría J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens.** 1989;33:408-14.

Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Type 1 Regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. **Semin Immunol.** 2011 June; 23(3): 202-208.

Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. **Immunology.** 2006 May;118(1):58-65.

Puviani M, Marconi A, Cozzani E, Pincelli C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. **J Invest Dermatol**. 2003;120(1):164–167.

Qian Y, Jeong JS, Maldonado M, Valenzuela JG, Gomes R, Teixeira C, Evangelista F, Qaqish B, Aoki V, Hans G Jr, Rivitti EA, Eaton D, Diaz LA. Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. **J Immunol**. 2012 Aug 15;189(4):1535-9.

Quaglino P, Antiga E, Comessatti A, Caproni M, Nardò T, Ponti R, Novelli M, Osella-Abate S, Fabbri P, Bernengo MG. Circulating CD4⁺ CD25^{bright}FOXP3⁺ regulatory T-cells are significantly reduced in bullous pemphigoid patients. **Arch Dermatol Res**. 2012 Oct;304(8):639-45.

Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, et al. Restricted heterogeneity of IgG subclasses in fogo selvagem (endemic pemphigus foliaceus). **N Engl J Med**. 1989;320:1463–1469.

Rocha-Alvarez R, Ortega-Loayza AG, Friedman H, et al. Endemic Pemphigus Vulgaris. **Arch Dermatol**. 2007;143:895-99.

Rodrigues DB, Pereira SA, dos Reis MA, Adad SJ, Caixeta JE, Chiba AM, Sousa RA, Rodrigues V Jr. In situ detection of inflammatory cytokines and apoptosis in pemphigus foliaceus patients. **Arch Pathol Lab Med**. 2009 Jan;133(1):97-100.

Roncarolo M-G, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings M K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol Rev** 2006;212, 28–50

Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SAP. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. **J Invest Dermatol**. 1985;85(6):538–541.

Roselino AM, Deghaide NHS, Donadi EA. HLA-A69 e HLA-DRB1*01 em pênfigo foliáceo. **Anais do 53º Congresso Brasileiro de Dermatologia**. 1998. Blumenau, SC, p.12.

Roselino, A. M. et al. Serum IgG from Pemphigus Foliaceus Patients Reacts Against Maxadilan. **J Invest Dermatol**, v. 117, n. 2, p. 460 (abstr.), 2001.

Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R. Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies. **Clin Dermatol**. 2013 Jul-Aug;31(4):374-81.

Sagi L, Sherer Y, Trau H, Shoenfeld Y. Pemphigus and infectious agents. **Autoimmun Rev**. 2008 Oct;8(1):33-5.

Sagoo P, Lombardi G, Lechler RI. Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ transplantation. **Front Immunol.** 2012;3:184.

Saha M, Harman K, Mortimer NJ, Binda V, Black MM, Kondeatis E, Vaughan R, Groves RW. Pemphigus vulgaris in White Europeans is linked with HLA Class II allele HLA DRB1*1454 but not DRB1*1401. **J Invest Dermatol.** 2010 Jan;130(1):311-4.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol.** 1995;155:1151-1164.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol.** 2004. 22:531-62.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell.** 2008;133:775-787.

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **Int Immunol.** 2009 Oct;21(10):1105-11.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity.** 2000 Apr;12(4):431-40

Salopek TG. Nikolsky's sign: is it 'dry' or is it 'wet'? **Br J Dermatol** 1997;136: 762-67.

Sampaio SAP, Rivitti EA. **Dermatologia.** 3 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2007. 1367 p.

Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowicz M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **J Exp Med.** 2007 Jun 11;204(6):1335-47. Epub 2007 Jun 4.

Sayama K, Yonehara S, Watanabe Y, Miki Y. Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 1994;103(3):330-334.

Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. **J Invest Dermatol.** 1995;104(1):33-37.

Seishima M, Iwasaki-Bessho Y, Itoh Y, Nozawa Y, Amagai M, Kitajima Y. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. **Arch Dermatol Res**. 1999;291(11):606–613.

Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. **Immunity** 2012; 36:873–84.

Shams S, Amirzargar AA, Yousefi M, Rezaei N, Solgi G, Khosravi F, Ansari-pour B, Moradi B, Nikbin B. HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris. **J Clin Immunol**. 2009Mar;29(2):175-9.

Shetty A, Marcum CB, Glass LF, Carter JD. Successful treatment of pemphigus vulgaris with etanercept in four patients. **J Drugs Dermatol**. 2009; Oct;8(10):940-3.

Simmonds MJ and Gough SC. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. **Clin Exp Immunol** 2004;136:1-10.

Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology**. 2004;112:38–43.

Stanley JR, Kiaus-Kovtun V, Sampaio SAP. Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol**. 1986;87:197–201.

Stanley JR. **Pemphigus**. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 6a. ed, Ed. McGraw Hill, 2003, vol I pp 558-567.

Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. **N Engl J Med**. 2006 Oct; 355(17):1800-10.

Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD: Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. **J Immunol**. 2005;174:164–173.

Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, Kawamura T, Kitamura R, Ando N, Shimada S. CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. **Dermatology**. 2007;214(3):210-20.

Sun L, Hurez VJ, Thibodeaux SR, Kious MJ, Liu A, Lin P, Murthy K, Pandeswara S, Shin T, Curiel TJ. Aged regulatory T cells protect from autoimmune inflammation despite reduced STAT3 activation and decreased constraint of IL-17 producing T cells. **Aging Cell**. 2012 Jun;11(3):509-19.

Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz C. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. **Immunology**. 2006 May; 118(1): 1–9.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **Int. Immunol**. 1998;10:1969.

Terras S, Gambichler T, Moritz RK, et al. Immunohistochemical analysis of FOXP3⁺ regulatory T cells in healthy human skin and autoimmune dermatoses. **Int J Dermatol**. 2013 Aug 22.

Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J Exp Med**. 1998;188: 287.

Thompson JA, Perry D, Brusko TM. Autologous regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes. **Curr Diab Rep**. 2012 Oct;12(5):623-32

Tron F, Gilbert D, Mouquet H, et al. Genetic factors in pemphigus. **J Autoimmunity**. 2005; 24:319-328.

Tsakiri N, Papadopoulos D, Denis MC, Mitsikostas D-D, Kollias G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3⁺ Treg-cell function and disease suppression in EAE. **Eur J Immunol**. 2012 Feb;42(2):403-412.

Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, Whitham RH, Bakke A, Jones RE, Offner H, Bourdette DN, Vandenbark AA. Functional assay for human CD4⁺CD25⁺ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. **J Neurosci Res**. 2003 Oct 15;74(2):296-308.

Vargas JH, Dasher DA, Li N, et al. Prevalence of Anti Desmoglein-3 Antibodies in Endemic Regions of Fogo Selvagem in Brazil. **J Invest Dermatol**. 2006;126:2044–8.

Veldman C, Pahl A, Beissert S, Hansen W, Buer J, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Inhibition of the Transcription Factor Foxp3 Converts Desmoglein 3-Specific Type 1 Regulatory T Cells into Th2-Like Cells. **J Immunol**. 2006 Mar 1;176(5):3215-22.

Verhagen J, Genolet R, Britton GJ, Stevenson BJ, Sabatos-Peyton CA, Dyson J, Luescher IF, Wraith DC. CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013 Jan 15;110(3):E221-30.

Vieira JP. Pênfigo foliáceo e síndrome de Senear-Uscher. São Paulo, Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, 1942.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Exp Med**. 2004 Apr 5;199(7):971-9.

Wang X, Brégégère F, Frušić-Zlotkin M, Feinmesser M, Michel B, Milner Y. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. **Apoptosis**. 2004;9(2):131–143.

Warren SJP, Lin MS, Giudice GJ, et al. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **N Engl J Med**. 2000;343:23–30.

Waschke J, Spindler V, Bruggeman P, Zillikens D, Schmidt G, Drenckhahn D. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. **J Cell Biol**. 2006;175(5):721–727.

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

Weber R, Monteiro F, Preuhs-Filho G, Rodrigues H, Kalil J, Miziara ID. HLA-DRB1*04:02, DRB1*08:04 and DRB1*14 alleles associated to pemphigus vulgaris in southeastern Brazilian population. **Tissue Antigens**. 2011 Aug;78(2):92-3.

Weyand CM, Hicok KC, Conn DL and Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**. 1992;117:801- 6.

Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **J Med Genet**. 2002 Aug;39(8):537-45.

Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. **Front Immunol**. 2012;3:178.

Wolf R, Matz H, Ruocco E, Ruocco V. The putative role of apoptosis in the induction of pemphigus. **Medical Hypotheses**. 2005;64(1):44–45.

Yan L, Wang J-M, Zeng K. Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. **Br J Dermatol**. 2012 October; 167(4): 768–777.

Ye ZJ, Zhou Q, Gu YY, Qin SM, Ma WL, Zin JB, Tao XN, Shi HZ. Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. **J Immunol**. 2010;185:6348–6354.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **J Clin Invest**. 2006;116:1310–1316.

Yokoyama T, Amagai M. Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice. **J Dermatol**. 2010 Mar;37(3):205-13.

Yokoyama T, Matsuda S, Takae Y, Wada N, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S. Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. **Int Immunol**. 2011 Jun;23(6):365-73.

Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, Krueger JG, Lowes MA. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. **J Invest Dermatol**. 2009;129:79–88.

Zeoti DM, Figueiredo JFC, Chiossi MPV, Roselino AMF. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Braz J Med Biol Res**. 2000;33:1065-8.

Zhang R, Huynh A, Whitcher G, Chang J, Maltzman JS, Turka LA. An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. **J Clin Invest**. 2013 Jan 2.

Zuccolotto I, Roselino AM, Ramalho LN, Zucoloto S. Apoptosis and p63 expression in the pathogenesis of bullous lesions of endemic pemphigus foliaceus. **Arch Dermatol Res**. 2003;295(7):284–286.

9. Anexos

Anexo 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AOS PACIENTES COM PÊNFIGO (aprovado pelo CEP-HCFMRP-USP – Processo de no. 8716/2013)

Referente ao projeto: RELAÇÃO DOS FATORES IMUNOGENÉTICOS E AMBIENTAIS NA ETIOPATOGENESE DOS PÊNFIGOS EM AMOSTRAGEM BRASILEIRA (Proc. HCRP no. 12248/2010)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa realizada por uma equipe de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP), a qual tem como coordenadora, a Professora Dra. Ana Maria F. Roselino. Esta pesquisa refere-se aos pênficos, doenças com formação de bolhas na pele e mucosas, como boca, nariz e genitais. Não é transmissível entre pessoas. Ainda não se sabe exatamente a causa desta doença. O que se sabe é que o organismo do doente forma anticorpos (que normalmente fazem a defesa do nosso organismo contra vírus e bactérias) que passam a atacar a pele e as mucosas. Fatores ambientais e genéticos têm participação no surgimento da doença, no entanto, ainda há muito que se conhecer sobre os pênficos.

A equipe de Dermatologia do Ambulatório de Dermatoses auto-imunes do HCFMRP, cujo atendimento é realizado às segundas-feiras, acompanha diversos pacientes com diagnóstico de pênfico. Desta forma, estamos iniciando uma pesquisa sobre as causas ambientais, imunológicas (formação de anticorpos), e genéticas de ambos os pênficos: vulgar e foliáceo. Estamos estudando principalmente a implicação de mosquitos, de agrotóxicos e de acometimento familiar no desencadeamento do pênfico. Para isso pedimos a colaboração de todos os pacientes com pênfico que são acompanhados no HCFMRP, através da permissão da coleta de aproximadamente 45 ml de sangue, um frasco de urina e mecha de cabelo, além de preenchimento de questionário. Os resultados serão sigilosos e não terão influência sobre sua medicação ou modificação de seu tratamento.

Para participar desta pesquisa não será necessário pagar qualquer quantia. Se você for convocado a participar da pesquisa fora do horário do seu atendimento ou internação no HCFMRP, você receberá ressarcimento dos seus gastos com transporte de ônibus e alimentação. Basta apresentar o comprovante da passagem. Quanto à alimentação, será pago o valor de R\$ 12,00. Seu tratamento não sofrerá qualquer influência. A qualquer momento você poderá desistir da participação na pesquisa sem ter nenhum prejuízo ao seu tratamento. Os resultados serão confidenciais. Desde já agradecemos e nos colocamos à disposição para qualquer esclarecimento. Serão assinadas duas cópias, sendo que uma ficará com o (a) Sr. (a).

Eu, _____ registro HC no. _____ li o termo de consentimento e aceito participar da pesquisa.

Paciente

Responsável

legal

Coordenadora: Professora Dra Ana Maria Roselino

CRM:38.450 CPF: 052.189.868-44

Ribeirão Preto, de _____ de _____

Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa HC FMRP



Ribeirão Preto, 09 de fevereiro de 2011

Ofício nº 423/2011
CEP/MGV

Prezada Professora,

O trabalho intitulado **“RELAÇÃO DOS FATORES IMUNOGENÉTICOS E AMBIENTAIS NA ETIOPATOGENESE DOS PÊNFIGOS EM AMOSTRAGEM BRASILEIRA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 317ª Reunião Ordinária realizada em 07/02/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12248/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª ANA MARIA FERREIRA ROSELINO
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Dermatologia

Anexo 3: Aprovação do Banco de Amostras de Pele e Sangue

 HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
www.hcrp.fmrp.usp.br 

Ribeirão Preto, 28 de fevereiro de 2007

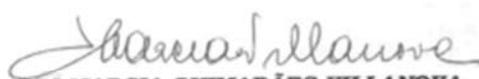
Ofício nº 572/2007
CEP/MGV

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa recebeu carta, onde Vossa Senhoria encaminha a proposta de criação de um banco de amostras de biópsias de pele e de sangue de pacientes com os diagnósticos de leishmaniose tegumentar americana, hanseníase e outras doenças granulomatosas.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 241ª Reunião Ordinária realizada em 26.02.2007, analisou a proposta de criação e a enquadrando na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 3605/2006.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª ANA MARIA FERREIRA ROSELINO
Laboratório de Biologia Molecular – Anexo B – FMRP-USP

10. Artigo

Abstract

Background: The role that CD4+CD25^{high} regulatory T (Treg) cells play in pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF), including decrease in the number or function of these cells, remains unclear. This study aims to characterize Treg cells function and frequencies in the peripheral blood as well as their distribution in the skin of patients with active PV and PF. **Methods:** All patients had active pemphigus and had no immunosuppressive treatment. Flow cytometry analysis of the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was performed in 12 patients (6 PV, 6 PF) and controls, and furnished the number and phenotypes of the CD4+CD25^{high} Treg cells. Functional analysis (5 PV, 5 PF) involved magnetic sorting of CD4+CD25⁺ and co-culture for 96h. Carboxyfluorescein succinimidyl ester staining dilution showed PBMC proliferation. Immunohistochemistry and confocal microscopy were performed in 6 biopsy samples of pemphigus lesions (4 PV, 2 PF) and peripheral samples of five of these same patients. **Results:** PV and PF patients had significantly decreased Treg cells frequency. Patients and controls did not differ significantly in terms of the Treg cells ability to suppress PBMC proliferation. Microscopic analysis of immunohistochemical staining for Foxp3 was similar in the 6 samples and showed an infiltrate of immunostained cells distributed preferentially in the upper dermis, with equivalent infiltrate in H&E staining. However, samples of perilesional biopsy showed sparse or absent Foxp3 immunostaining, besides inflammatory infiltrate observed by H&E. **Conclusions:** Our findings indicate that PV and PF patients present significantly lower frequency but suggest unaltered function of CD4+CD25^{high} Treg cells.

Introduction

Pemphigus describes a group of severe, chronic, tissue-specific autoimmune blistering diseases that affect the skin and mucous membranes. Pathogenic IgG autoantibodies mediate these diseases, thereby disrupting cell-cell adhesion among keratinocytes and causing acantholysis. In pemphigus foliaceus (PF), autoantibodies target desmoglein (Dsg) 1, which culminates in acantholysis and blistering in the outer skin layers. In pemphigus vulgaris (PV), autoantibodies target Dsg1 and Dsg3, leading to skin and mucous membrane blistering^{1,2}.

Autoantibody production in pemphigus is thought to be T cell-dependent^{3, 4}. Additionally, autoreactive T cells may play a role in generating autoantibodies⁵. The disruption of mechanisms that maintain peripheral tolerance in pemphigus may involve regulatory T (Treg) cells that actively suppress the immune system and diminish the activation of other T cells in a contact-dependent mechanism^{6, 7, 8}.

Several studies have been showing that naturally occurring Tregs are very important for the maintenance of immunological self-tolerance. Natural Tregs constitutively express high levels of CD25, the transcription factor forkhead box P3 (Foxp3), and others surface markers that are not specific, but assist in their identification, among which we can mention CTLA4, glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) and activation markers as the chemokine receptor CCR4^{9, 10, 11, 12}. The ligand of CCR4 - CCL17 - is constitutively expressed by endothelial cells of postcapillary venules of the dermis, and it was shown that the Treg chemokine receptor CCR4 undergoes a process of upregulation in recognizing antigens in secondary lymphoid organs, and directs the migration of Tregs to the skin during inflammatory and autoimmune processes, which would modulate these responses. In the absence of the marker CCR4, Treg migration to the skin is impaired¹³.

The studies on how Treg cells and human autoimmunity are related have verified a quantitative or functional Treg cells impairment in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) during autoimmune disorders. Sugiyama et al. (2007) observed that the Treg cells proportion in the peripheral blood of PV patients was decreased as compared with healthy controls. However, it is not yet known whether the function of Treg cells in pemphigus is defective¹⁴.

Treg cells can occur in healthy skin, but their absolute number is low^{15, 16}. These cells are expected to exist in higher number in normal skin as compared with diseased skin, because they might suppress autoimmune processes. Regarding Treg cells characterization in pemphigus lesions, a larger number of Treg cells seem to emerge in skin specimens of pemphigus patients as compared with healthy controls^{17, 18}.

This study aimed to assay Treg cells number and function in peripheral blood as well as characterize Treg cells in the lesions of PV and PF patients.

Methods

Patients

All PF and PV patients of this study were adults, had active disease and did not use immunosuppressive agents for at least 60 days prior to blood or skin collection. All the participants

had clinical, histological, and direct immunofluorescence diagnosis of pemphigus; most of the participants had active pemphigus also confirmed by ELISA antidesmoglein.

Flow cytometry studies were conducted on 12 patients (6 PV and 6 PF) and 12 healthy volunteers with median age of 42.5 and 29 years, ranging between 19-73 and 23-71 years, respectively. The proliferation assay involved 10 patients (5 PV and 5 PF) and 10 healthy controls, with median age of 51.5 and 30 years, ranging between 19-73 and 26-71 years, respectively (Tables 1 and 2).

Biopsy specimens of skin lesions were obtained from six patients (2 PV and 4 PF); perilesional lesions were collected from five of these participants. In this group, the median age was 40.3 years (18-57 years). The samples were submitted to immunohistochemistry (IHC) and confocal microscopy. The patients and controls did not significantly differ in terms of race or color (not shown).

All the subjects signed an informed consent approved by the Institutional Ethics Committee (Process HCRP 12248/2010).

Flow Cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and stained by direct immunofluorescence using four-color flow cytometry FACSCanto II (BD).

After PBMC counting, 2×10^5 cells were washed, re-suspended in 100 μL of PBS, and incubated with sera from healthy rabbits diluted 1:20 (to block nonspecific binding) for 30 min, at room temperature (RT). To analyze cell surface molecule expression, specific monoclonal antibodies (mAbs) were added at a ratio of 1 μL to 10^6 cells, which was followed by incubation for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, according to the manufacturer's instructions. To determine intracellular Foxp3 protein expression, PBMCs were first incubated with surface mAbs, followed by fixing and permeabilization with the Human Foxp3 Buffer Set (eBioscience, San Diego, Calif., USA) and incubation with anti-Foxp3 mAb, according to the manufacturer's instructions (eBioscience).

The following mAbs were used: anti-C4-FITC, CD4-PE, CD4-APC and CCR4-PE from BD Pharmingen (San Diego, Calif., USA); and anti-CD4-PECy7, CD-25-PECy7, CD152-PE (CTLA4), and Foxp3-PE from eBioscience (San Diego, Calif., USA). Samples were analyzed using the software FACSDiva (BD) and FlowJo (TreeStar).

Treg Cells Separation

CD4+CD25negative (neg) and CD4+CD25+ T cells were isolated by negative selection using the Regulatory T cell Separation Kit (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany), according to the manufacturer's instructions. Briefly, CD4+ T cells were negatively selected from the total PBMCs, followed by positive selection on anti-CD25 magnetic beads, to separate CD4+CD25neg cells and CD4+CD25+ cells. The CD4+CD25+ cells were counted in a trypan blue dye and immediately used in the proliferation assay.

Proliferation Assay

The proliferation assay helped to test the capacity of CD4+CD25+ T cells to inhibit PBMC proliferation in response to polyclonal stimulation (anti-CD3 mAb, BD Biosciences, San Diego, USA). Total PBMC cells were stained with CFSE and cultured in the presence of purified CD4+CD25+ cells, 1 to 10 or 1 to 5 PBMC. A total of 2×10^5 cells were added per well in flat bottomed 96 wells plates and cultured with or without anti-CD3 2,5 µg/ml. Cells were incubated at 37 °C, under 5% CO₂ atmosphere, for 96 h. Then, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and the cells were analyzed regarding staining dilution. For each sample, the CFSE dilution was evaluated in anti-human CD3-stimulated cultures, in the presence or absence of CD4+CD25+ purified cells, autologous or from the healthy control. For each sample and co-culture condition, controls in the absence of stimulus showed that cell proliferation was absent or negligible. Stimulation with anti-human CD3 elicited significant proliferation in all the participants. Samples were acquired in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FACSDiva (BD) and FlowJo software (TreeStar).

Immunohistochemistry/Confocal Microscopy

Skin biopsy specimens obtained for immunohistochemistry (IHC) consisted of skin lesions collected from six pemphigus patients (2 PV, 4 PF) and five apparently normal skin samples taken from the same patients, removed two inches away from the lesion and located where no lesions occurred (perilesional samples).

Expression of the Treg cell marker Foxp3 in the pemphigus lesions and perilesional samples was analyzed by IHC. Skin specimens, immediately frozen at -80 °C in liquid nitrogen, were cut into 5-µm thick sections, air-dried, and fixed with acetone (5 min). Specimens were defrosted at RT for 30 min and washed; then,

endogenous peroxidase was blocked using a hydrogen peroxide solution at 3%. The Foxp3 antibody was applied (1:50; Santa Cruz Biotechnology, USA), and the samples were incubated in a humid chamber at 4 °C, overnight. The reactions were developed with diaminobenzidine (DAB, Novocastra, UK) for 5 min and counterstained with Harris hematoxylin. Finally, the slides were dehydrated in an ascending series of alcohol and mounted for analysis. Negative controls were obtained by replacing the primary antibody with bovine serum albumin (BSA); positive controls were set according to manufacturer's recommendation.

For confocal microscopy, skin samples collected from patients (1 PV; 3 PF) were marked for CD4 and CD25. Five-micrometer-thick cut cryostat sections were obtained from the frozen tissue sample (-80 °C) of each patient, washed with PBS, fixed with paraformaldehyde 4% (pH 7.4), and blocked with PBS-BSA 1% (30 min, at RT). Primary antibodies against human CD4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA) and CD25 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA) were prepared in PBS-BSA 1% and incubated with the sections at 4 °C, overnight. Secondary antibodies (1:500) were prepared and incubated with the sections at RT, for 1 h. Sections were visualized under a Zeiss LSM 510 UV Meta laser scanning confocal microscope.

All the samples were stained with hematoxylin-eosin (H&E), to characterize tissue histological changes.

Statistical Analysis

The results are presented as medians (25th–75th percentile). The Mann-Whitney test, the Wilcoxon test, and the Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test were used. Statistical analysis was performed using the Prism GraphPad 6.0 software. The significance was set at $p \leq 0.05$. Flow cytometry analysis was performed with the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Results

PV and PF patients have lower CD4+CD25^{high} Treg cells frequency

Our data revealed significantly lower CD4+CD25^{high} Treg cells percentage in the peripheral blood of patients with PV (1%, 0.86-1.11; n = 6) and PF (1.01%, 0.7-1.33; n = 6) as compared with healthy controls (1.57%, 1.16-1.87; n = 12; p = 0.02 and p = 0.05, respectively - Figure 1 A and B). When grouping of the patients with PF and PV and comparing with the controls it was seen a decreased Treg cells percentage in the pemphigus group (PV and PF) (p = 0.0013). The frequency of the total CD4+CD25+ T cell population in patients with pemphigus was similar to that found in the controls (data not shown).

Stratification by age did not evidence any difference in the CD4+CD25^{high} expression between patients with pemphigus (PV or PF) aged below or above 50 years (p = 0.84). Treg cells frequency was similar for the localized and disseminated forms of PV and PF (p = 0.36; data not shown).

Compared with controls, pemphigus patients (PF and PV) presented diminished CD4+CD25^{high}Foxp3+ frequency (p = 0.001, Figure 1C); the CCR4 expressed by CD4+CD25^{high} T cells was also lower in these patients (p=0.04). The CD4+CD25^{high} T cells of patients and controls did not differ in terms of CTLA4 expression (p=0.16, Figure 1D). No correlation was seen between CD4+CD25^{high} and anti-Dsg titers (Spearman R = -0.15; p = 0.7) or between CD4+CD25^{high} and disease duration or time without immunosuppressive treatment (R = 0.19; p = 0.5 and R = -0.16; p = 0.6, respectively).

Circulating CD4+CD25+ T cells have sustained inhibitory function in PV and PF patients

The PBMCs from PV patients, PF patients and healthy controls were cultured alone, in the presence of anti-CD3 and in the presence of anti-CD3 and autologous or co-cultured CD4+CD25+ T cells isolated from the patient or the control.

We compared the suppressive capacity of the CD4+CD25+ T cells obtained from each individual, and observed that these cells inhibited PBMC proliferation at a 1:10 ratio. This inhibition was more evident at a 1:5 CD4+CD25+ T cells/PBMCs ratio in PV, PF, and healthy controls (Figure 2).

It was also assessed whether the T lymphocytes from pemphigus patients and healthy controls had different susceptibility to the CD4+CD25+ T cell-mediated suppression of the proliferative response. The CD4+CD25+ T cells from pemphigus patients abated the proliferation of PMBC T lymphocytes from pemphigus patients (PF and PV) and healthy controls with similar intensity. The same occurred when we tested the CD4+CD25+ T cells from healthy controls (Figure 2). Together, these data suggest that neither the PV nor PF patients exhibit impaired Treg cells inhibitory function.

CD4+, CD25+, and Foxp3+ Tregs in the skin of patients with PV and PF

The H&E staining showed inflammatory infiltrate in the pemphigus lesions (4 PF, 2 PV) and perilesional samples (3 PF, 2 PV). There was a preferably lymphohistiocytic inflammatory infiltrate, more intense in samples of pemphigus lesions. Immunohistochemistry of both PV and PF patients revealed an infiltrate of Foxp3+ immunostained cells that preferentially emerged in the upper dermis as foci of Foxp3+ cells (Figure 3).

Confocal microscopy helped to verify double CD4+CD25+ immunostaining and characterize Treg cells in pemphigus skin lesions. Figures 3 and 4 show CD4+ and CD25+ expression in the skin specimens of pemphigus patients.

Discussion

Treg cells deficient function or numerical impairment has been investigated in several autoimmune diseases. Altered Treg cells may be involved in deteriorated immunological self-tolerance in pemphigus^{14, 17, 18}.

The present study verified significantly reduced CD4+CD25^{high} Treg cells frequency in patients with PV and PF. None of the participants had been on any immunosuppressant treatment for at least 60 days, so such medications did not interfere in the results. Additionally, the disease was active in all the patients, as confirmed by ELISA anti-Dsg titers in most cases.

Pemphigus constitutes a model of autoimmune skin blistering disease. Treg cells characterization in both PV and PF is important: it helps to understand how T cells participate in autoantibody production and self-tolerance deterioration. Our data agree with those reported in the study of Sugiyama et al. (2007) regarding PV, but not PF. In that study, authors did not detect any difference in Treg cells number in PF, comparing to controls¹⁴.

To the best of our knowledge, this is the first study regarding Treg cells function in pemphigus. The CD4+CD25+ T cells of PV or PF patients did not differ in terms of their ability to suppress PBMC lymphocytes proliferation stimulated by anti-CD3. This raises interesting questions about Treg cells peripheral reduction in these patients: is a reduced number of Treg cells with preserved function enough to modulate and inhibit autoreactive T cells? Does the number of Treg cells decrease because these cells are recruited to the site of the lesions?

Studies have demonstrated that Treg cells must migrate to peripheral organs, to effectively regulate local inflammation^{19, 20, 21}. Previous reports have shown similar or elevated number of Treg cells in PV lesions as compared with controls^{17, 18}. Because it is thought that Treg cells suppress autoimmune processes, a higher number of Treg cells would be expected in apparently normal skin adjacent to a pemphigus lesion as compared with the affected skin. Hence, the disease would result from impaired peripheral tolerance.

The findings of IHC and confocal microscopy of biopsy specimens in our study help to answer the questions raised above and to characterize the preferential Treg cells distribution in the lesions of patients with PV and PF as compared with perilesional skin (apparently normal skin biopsy sections collected two inches away from the analyzed lesion). The six (4 PF and 2 PV) samples evidenced similar distribution of Foxp3+ immunostained cells. They were preferably localized in the upper dermis and emerged as foci of Foxp3+ cells in IHQ, with inflammatory infiltrate also seen in the adjacent skin sections analyzed by H&E staining. Perilesional skin biopsies displayed no foci of Foxp3+ cells, despite inflammatory infiltrate seen in the H&E staining. Therefore, it is possible to infer that the Treg cells observed in the lesions had been recruited after acantholysis and suggest that Treg cells would be preferentially targeting to sites of injury. Further studies of immunohistochemistry and confocal microscopy will be useful for further characterization and quantification of Treg in the pemphigus lesions as well as in the description of the phenotype of these cells.

Our study detected diminished Treg cells number in the peripheral serum of both PV and PF patients, but the function of these cells remained unaltered in these individuals. Foxp3+ immunostaining occurred in the upper dermis of both PV and PF patients, with no similar findings in perilesional sections. These results provide clues that will help to elucidate the role that Treg cells play in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus pathogenesis.

Acknowledgements

This research was funded by FAPESP (process number 2010/51729-1).

References

1. Abréu-Vélez AM, Reason IJ, Howard MS, et al. Endemic pemphigus foliaceus over a century: Part I. *N Am J Med Sci*. 2010 Feb;2(2):51-9.
2. Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, et al. Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013 Jul-Aug;31(4):374-81.
3. Nishifuji K, Amagai M, Kuwana M, et al. Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. *J Invest Dermatol*. 2000 Jan;114(1):88-94.

-
4. Yokoyama T, Amagai M. Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice. *J Dermatol*. 2010 Mar;37(3):205-13. Review.

 5. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, et al. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72 Suppl 2:ii85-9. Epub 2012 Dec 19. Review.

 6. Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1159-66. Review.

 7. Veldman C, Pahl A, Hertl M. Desmoglein 3-specific T regulatory 1 cells consist of two subpopulations with differential expression of the transcription factor Foxp3. *Immunology*. 2009 May;127(1):40-9.

 8. Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect*. 2009 Apr;11(5):594-8. Review.

 9. Iellem A, Mariani M, Lang R *et al*. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2001; 194: 847–53.

 10. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299:1057-61.

 11. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004. 22:531-62.

 12. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490–500.

-
13. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1335-47. Epub 2007 Jun 4.
14. Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, et al. CD4+CD25high regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. [Dermatology](#). 2007;214(3):210-20.
15. de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, et al. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem*. 2007 Sep;55(9):891-8.
16. Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, et al. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol*. 2008 Jun;158(6):1256-63.
17. Arakawa M, Dainichi T, Yasumoto S, et al. Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Dermatol Sci*. 2009 Mar;53(3):228-31.
18. Terras S, Gambichler T, Moritz RK, et al. Immunohistochemical analysis of FOXP3+ regulatory T cells in healthy human skin and autoimmune dermatoses. *Int J Dermatol*. 2013 Aug 22.
19. Chow Z, Mueller SN, Deane JA, et al. Dermal Regulatory T Cells Display Distinct Migratory Behavior That Is Modulated during Adaptive and Innate Inflammation. *J Immunol*. 2013 Aug 12.
20. Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, et al. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3097-104. Epub 2005 Jul 12.
21. Yurchenko E, Tritt M, Hay V, et al. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med*. 2006 Oct 30;203(11):2451-60.

Tables and Figures legends

Table 1. Clinical and immunological data of the studied patients with pemphigus

Id.	Age	Sex	Clinical ^a	Elisa Anti-Dsg		Medication status		Treg/ CD4 (%)	Group		
				1	3	No previous treatment	Time without medication (months)		Proliferation Assay	Flow Cytometry	Skin Biopsy
PF patients (n=8)											
PF1	52	M	L	412.4			29			x	
PF2	24	M	D	174.2		x	-			x	x
PF3	33	M	L	82.8			2			x	
PF4	57	F	L	173.8			3		x	x	
PF5	59	M	D	-			216		x		
PF6	19	M	D	188.0		x	-		x	x	x
PF7	35	F	D	47.0			7			x	x
PF8	32	F	D	178.2		x	-		x		x
PV patients (n=7)											
PV1	49	M	D	21.4	37.8	x	-				x
PV2	36	M	D	22.5	127.6	x	-		x		x
PV3	53	M	L	121.18	75.6		5		x		x
PV4	73	F	L	-	152.5	x	-		x		x
PV5	62	F	L	100.0	-		3		x		x
PV6	50	M	L	30.1	141.2		22		x		x
PV7	28	M	L			x	-				x

a. Clinical phenotype: Localized (L) or disseminated (D). Localized forms in pemphigus vulgaris are patients that present mucosal involvement or scalp lesions only. In pemphigus foliaceus, localized forms are lesions restricted to the face, upper chest, and back.

Table 2. Statistical analysis of the demographic data from pemphigus patients and controls

Flow cytometry group						
	PF (n = 6)	Controls PF (n = 6)	<i>T test</i>	PV (n = 6)	Controls PV (n = 6)	<i>T test</i>
Age (y-o)	34 (22.7-53.2)	27.5 (25.2-29.5)	p=0.3	51 (34-64.7)	32.5 (29-56)	p=0.3
Sex M/F	4/2	3/3	p=0.66	4/2	2/4	p>0.9
Proliferation Assay Group						
	PF (n = 5)	Controls PF (n = 5)	<i>T test</i>	PV (n = 5)	Controls PV (n = 5)	<i>T test</i>
Age (y-o)	35 (25.5-58)	29 (27.5-32)	p=0.31	53 (43-67.5)	34 (29-61)	p=0.06
Sex M/F	2/3	2/3	p=0.3	3/2	2/3	p>0.99

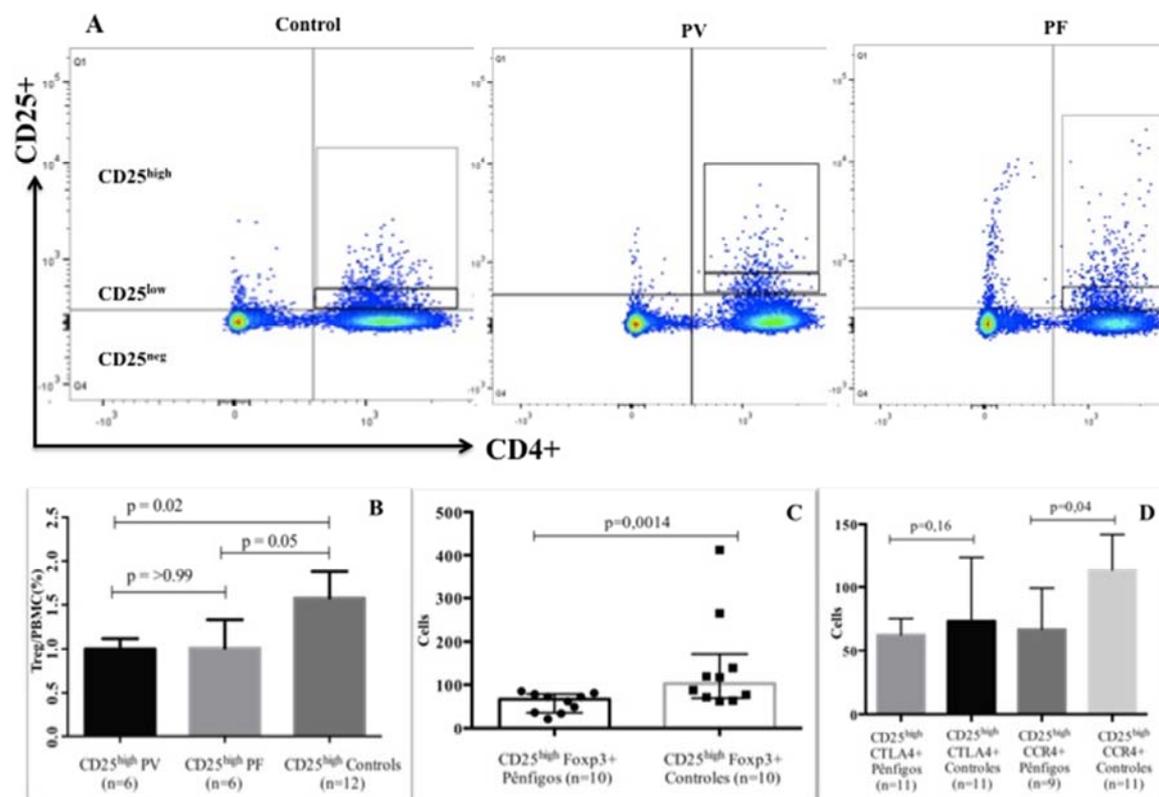


Figure 1. CD4+CD25^{high} cells in the peripheral blood of patients with pemphigus vulgaris (PV), pemphigus foliaceus (PF), and controls. **(A)** Flow cytometry diagram showing CD25^{high}, CD25^{low} and CD4+CD25⁻ T cells in the peripheral blood (representative diagram shows a PF and PV patients and a healthy control of a total of 12 independent experiments). **(B)** The results of flow cytometry show the percentage of immunostained cells with CD4 expressing high levels of CD25 (CD25^{high}) in relation to the total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients and controls. The CD25^{high} T cells are reduced in PV and PF compared with controls. **(C)** CD4+CD25^{high}Foxp3⁺ expression in the peripheral blood of patients with pemphigus and healthy controls. The ordinate shows the absolute number of cells immunostained with CD4, CD25^{high} and Foxp3 in PBMC sample of 2×10^5 cells. Notice the reduction in number of CD4+CD25^{high}Foxp3⁺ cells in patients with pemphigus, compared to controls ($p = 0.0014$). **(D)** CD4+CD25^{high}CTLA4⁺ and CD4+CD25^{high}CCR4⁺ expression in the peripheral blood of patients with pemphigus and healthy controls. The ordinate shows the absolute number of PBMCs expressing CD4+CD25^{high}CTLA4⁺ and CD4+CD25^{high}CCR4⁺ in a 2×10^5 cells sample. Notice the reduction in number of CD4+CD25^{high}CCR4⁺ cells in patients with pemphigus, compared to controls ($p = 0.04$).

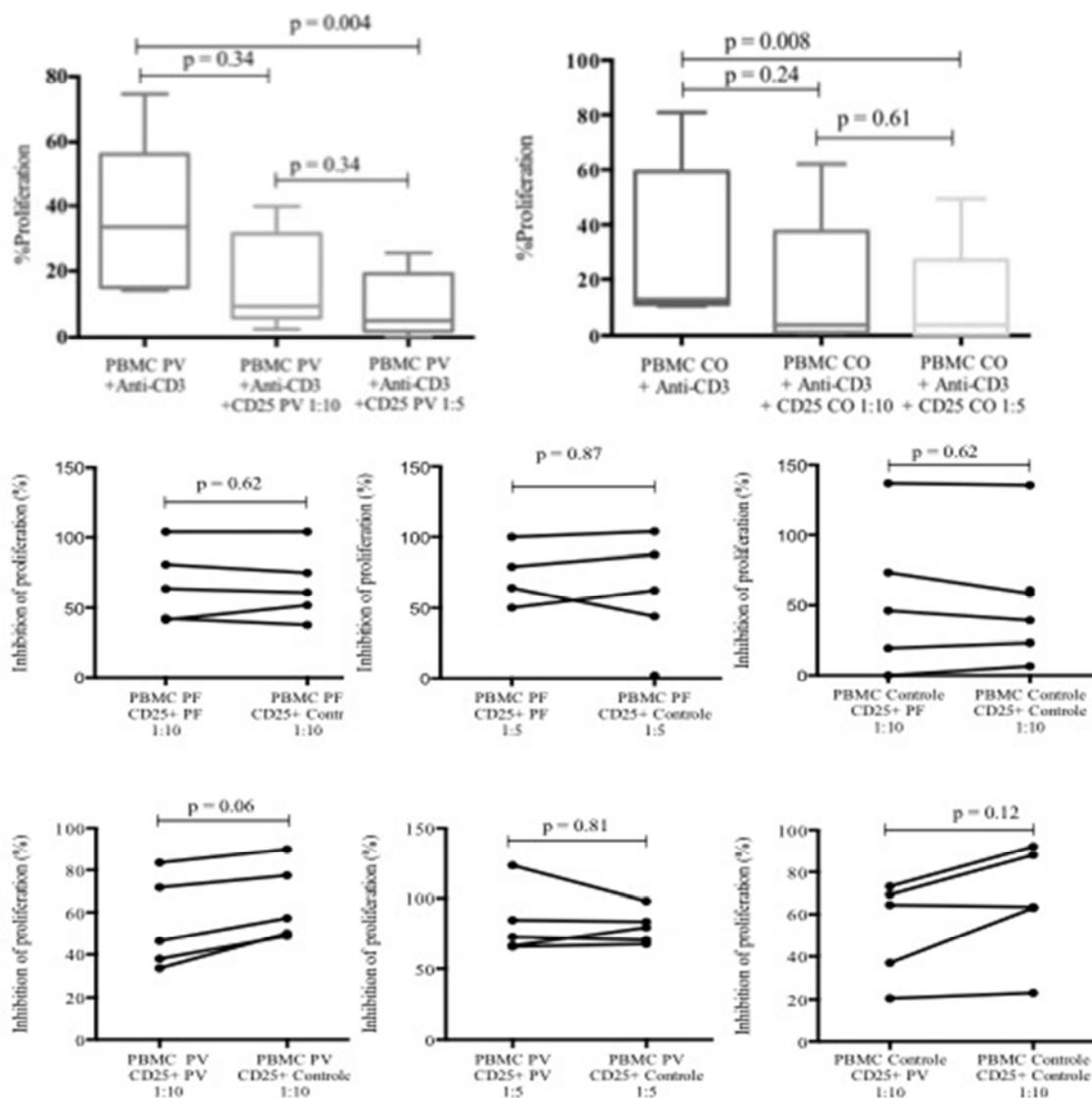


Figure 2. PBMC proliferation suppression assay: inhibitory effect of the CD4+CD25+ cells on PBMC proliferation in pemphigus patients and controls (CO), as assessed by proliferative stimulation with anti-CD3. CD4+CD25+ cells isolated from PV and PF patients and healthy controls were cultured in the presence of PBMC cells (autologous or co-cultured) and stimulated with anti-human CD3 chain monoclonal antibody (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were cultured in the proportion of 1 CD4+CD25+ cell to 5 or 10 total PBMC for 96 hours. The data is shown as percentage of inhibition of proliferation (PBMC and anti-CD3 compared to PBMC, anti-CD3 and CD25+ cells proliferation). **A and B.** The presence of autologous CD4+CD25+ cells of PV patients and controls inhibits PBMC proliferation, as seen in results obtained by increasing concentration of these cells in the culture. Results are expressed as median of five independent experiments in PV patients and healthy controls (Friedman test for paired samples, followed by Dunn's multiple comparison test). **C-H.** Inhibitory effect on proliferation of PBMC stimulated with anti-CD3 in the presence of CD25+ cells of PV and PF patients and controls. There was no significant difference in the ability of CD25+ cells from patients or controls to inhibit PBMC proliferation, autologous or co-cultured, in the rate of 1 CD4+CD25+ cell to 5 or 10 PBMC cells. Results show percentages of inhibition of suppression of PBMC proliferation by CD4+CD25+ cells in the proportion of 1 CD4+CD25+ cell to 10 PBMC (n=5 independent experiments in PV and 5 in PF, paired samples) and of 1 CD4+CD25+ cell to 5 PBMC (n=4 independent experiments in PV and 5 in PF, paired samples). Statistical analysis: two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

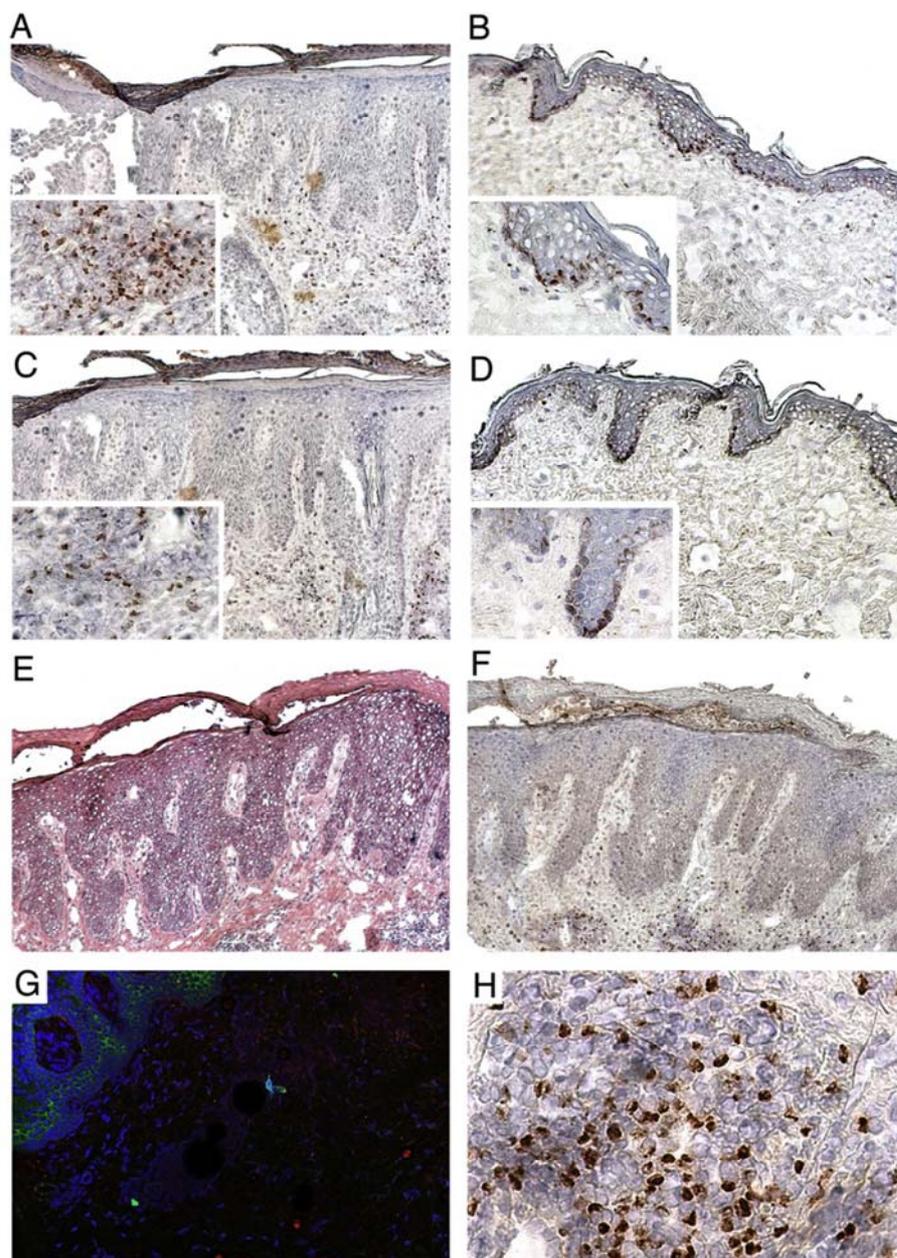


Figure 3. Hematoxylin-eosin (H&E), immunohistochemical staining and confocal microscopy. On the top, immunohistochemical staining for Foxp3 in a skin sample of a patient with pemphigus vulgaris (**A, B**) and a patient with pemphigus foliaceus (**C, D**). **A** and **C** represent active lesions, and **B** and **D**, perilesional samples. In active lesions (**A, C**), Foxp3+ cells are preferentially distributed in the superficial dermis (magnification 10x and 40x). In perilesional samples (**B, D**) Foxp3+ cells are scarce or absent (10x, 40x insert). Below, hematoxylin-eosin (H&E) staining (**E**), Foxp3 immunohistochemical staining (**F, G**) and confocal microscopy (**H**) of sample of skin biopsy from patient with pemphigus foliaceus. **E**: H&E staining shows subcorneal acantholysis and exocytosis of polymorphonuclear cells in the epidermis. In the dermis, there was moderate lymphohistiocytic inflammation, **F and H**: Immunohistochemical staining for Foxp3. Presence of numerous Foxp3+ cells in the papillary dermis and perivascular, with several outbreaks of positivity. **H**: Foxp3+ infiltrate in the papillary dermis (magnification 10x, 40x). **G**: confocal microscopy showing double labeling immunofluorescence for CD4 (Alexa 488 - green) and CD25 (red Alexa 647-). Diamino-2-phenylindole (DAPI) was used for labeling of nuclear genetic material (blue). Arrows indicate some of the dual foci of CD4+CD25+ (Treg) staining (20x magnification).

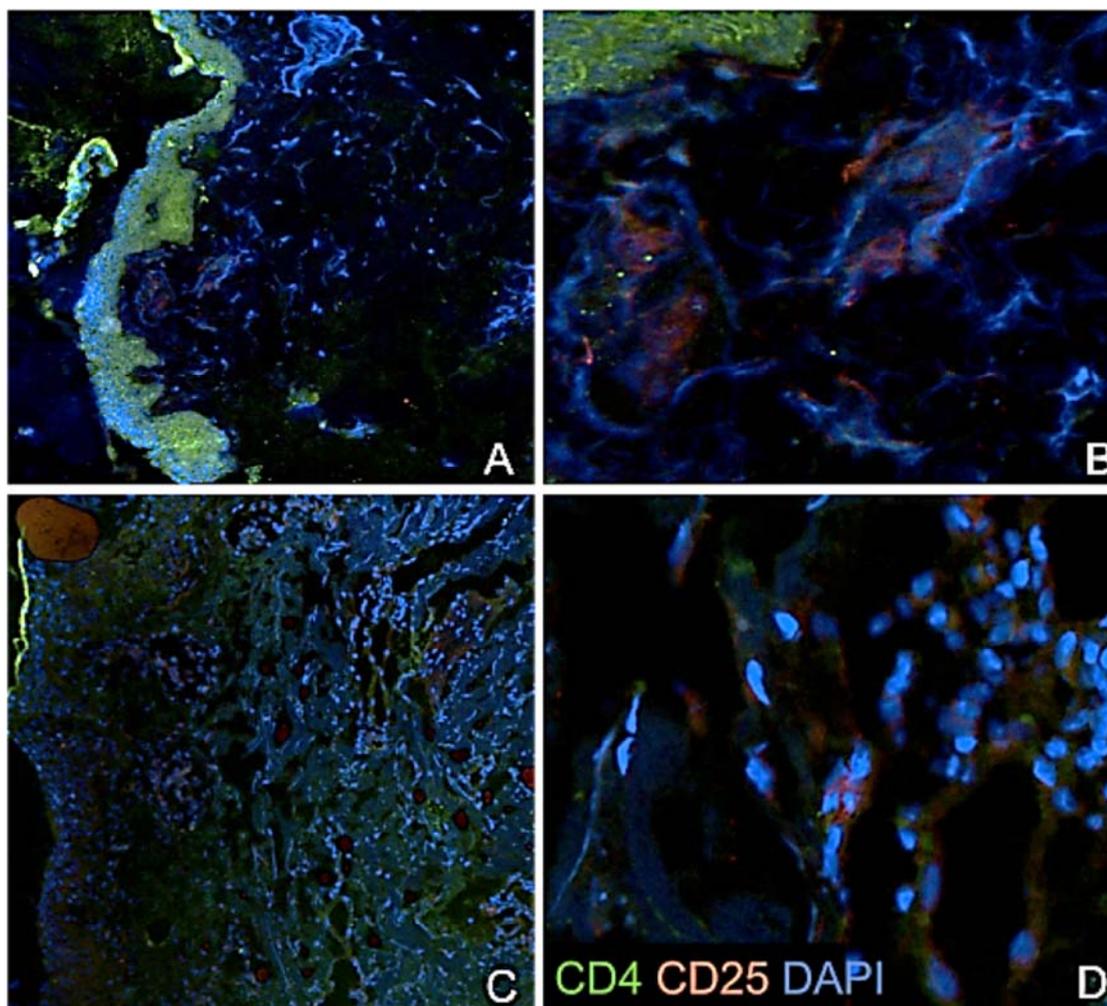


Figure 4. Double-label immunofluorescence staining for CD4 (Alexa 488 - green) and CD25 (Alexa 647 - red) in two skin biopsies of pemphigus foliaceus patients. Diamino-2-phenylindole (DAPI) was used as nucleus counterstaining. Images were taken using confocal microscopy; merged pictures are shown. **A, C** shows the original magnification-20x; **B, D:** confocal images at 20x magnification and 5x zoom showing CD4+CD25+ Treg cells double-staining.