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

TAMIRIS AMANDA JÚLIO

**MARCADORES SOROLÓGICOS *BULLOUS PEMPHIGOID* 180/230 E FATOR
NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) NA RELAÇÃO
PENFIGOIDE BOLHOSO E DEMÊNCIA**

RIBEIRÃO PRETO

2016

TAMIRIS AMANDA JÚLIO

**MARCADORES SOROLÓGICOS *BULLOUS PEMPHIGOID* 180/230 E FATOR
NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) NA RELAÇÃO
PENFIGOIDE BOLHOSO E DEMÊNCIA**

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

Área de concentração: Clínica Médica.

Opção: Investigação Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

RIBEIRÃO PRETO

2016

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

Júlio, Tamíris Amanda

Marcadores sorológicos *Bullous Pemphigoid* 180/230 e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na relação penfigoide bolhoso e demência/ Tamíris Amanda Júlio; Orientadora Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino. – Ribeirão Preto, 2016. 123f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica.

1. Penfigoide Bolhoso. 2. Doenças Neurológicas. 3. Demência. 4. BDNF. 5 BP180. 6. BP230

JULIO, T. A.. Marcadores sorológicos *Bullous Pemphigoid* 180/230 e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na relação penfigoide bolhoso e demência.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica. Essa Dissertação compõe o projeto Temático FAPESP de número: 2010/51729-2.

Aprovada em: _____

Banca examinadora

Prof. Dra. Ana Maria Roselino Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação a todos os idosos que tive a oportunidade de conhecer durante a minha vida acadêmica, profissional e pessoal. Os idosos são seres iluminados que acumulam sabedoria ao longo da sua jornada e nos presenteiam com seus conselhos e serenidade.

Expresso minha sincera gratidão a todos os idosos que gentilmente se dispuseram a participar desta pesquisa, ressaltando que foram essenciais para o desenvolvimento da mesma.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados e queridos pais, Maria e Aparecido, que foram os meus primeiros professores a me ensinarem os eternos valores da vida. Com vocês aprendi exemplos de honestidade, simplicidade e perseverança que me fortaleceram a cada dia durante o caminho acadêmico percorrido. Eu serei eternamente grata por tudo o que fizeram para eu me tornar a pessoa de hoje.

À minha madrinha Rosa e meu avô Antônio, pela paciência neste período e por compreenderem que o amor que nos une é muito maior que a distância que nos separa. Um agradecimento em especial para o meu avô que, além de ser meu ídolo, foi o responsável pela minha alfabetização. Sua paciência e amor ao me ensinar a escrever e ler as primeiras palavras foram essenciais na minha formação e contribuíram imensamente para eu chegar até aqui.

Ao meu amigo, namorado e grande companheiro Matheus, que se doou em silêncio e aceitou a viver comigo meu sonho de concretizar essa etapa, pois incontáveis foram as vezes que minha ansiedade e preocupação foram amenizadas por você, mantendo-me firme diante dos desafios, numa união que me incentivava a prosseguir.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Roselino, por ter me acolhido ao seu grupo de pesquisa e ter depositado sua confiança em mim ao me oferecer a oportunidade de trabalhar com este projeto. Imensa é a gratidão que tenho por todo crescimento científico e intelectual que adquiri com a presença e influência dessa competente e brilhante pesquisadora. Professora, obrigada pela orientação, dedicação, incentivo, oportunidades e pelos conselhos tanto no âmbito acadêmico quanto na vida pessoal.

Ao Prof. Dr. Julio César Moriguti que gentilmente aceitou a compartilhar seus conhecimentos, e que me acolheu e abriu as portas para a pesquisa no Ambulatório de

Demências (GEDEM); agradeço todas as experiências que tive no GEDEM e pelo aprendizado que adquiri para a vida. Obrigada pelas valiosas contribuições e sugestões.

Ao Prof. Dr. André Messias, por permitir que eu frequentasse o Ambulatório de Cataratas para que eu pudesse realizar parte deste trabalho.

A Aline Lobo, que inicialmente me introduziu ao Laboratório e Ambulatório de Dermatologia, e que teve a paciência de me passar todas as tarefas de TT3.

A Aline Turatti, pelo auxílio nos experimentos de imunofluorescência, pelo conhecimento compartilhado, e também pela amizade e conselhos de vida.

A Natália de Paula, pela sua paciência em me auxiliar na aprendizagem das técnicas laboratoriais, em especial o ELISA, que foi fundamental nesse projeto. Obrigada também por ser atenciosa e estar sempre disposta no auxílio de minhas dúvidas.

Ao Sebastián Vernal Carranza, por toda sabedoria compartilhada e pela dedicação e auxílio que contribuíram imensamente na idealização desse projeto.

A Nathália Citta, bolsista TT3 da FAPESP, que incansavelmente foi minha parceira de coleta de amostras de sangue.

Ao Leonardo La Serra, pela amizade e por ser essa pessoa tão prestativa, ao qual eu vivo recorrendo.

A Ludmilla Figueiredo Vale Fontanelle, pela companhia nos ambulatórios e pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas que cursamos juntas.

Aos queridos colegas Daniela Nascimento, Aline Machado, Maria Brochado e Ciro Gomes, por sempre contribuírem com seus ricos conhecimentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Enfim, a todos do Laboratório de Dermatologia, pelos conhecimentos compartilhados, pela excelente convivência e pela troca de experiências que com certeza enriqueceram e facilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

A Cristina, secretária da Dermatologia, pela atenção e disponibilidade em sempre ajudar.

A todos os médicos assistentes e residentes dos ambulatórios de Dermatoses Autoimunes, Demências e Catarata, pelo conhecimento compartilhado na discussão de casos dos pacientes envolvidos nesta pesquisa.

Ao extraordinário corpo docente da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e a todos os envolvidos na parte administrativa que tornaram possível a realização deste trabalho e contribuíram para minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido a este estudo.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

JÚLIO, T.A.. Marcadores sorológicos *Bullous Pemphigoid* 180/230 e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na relação penfigoide bolhoso e demência. 2016. 123f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: Penfigoide bolhoso (PB) resulta da produção de autoanticorpos contra proteínas hemidesmossomais BP (*Bullous Pemphigoid*) 180 e/ou 230, acomete os idosos, e está associado com doenças neurológicas (DN), especialmente com a demência (DEM). BP180/230 foram identificadas no Sistema Nervoso Central (SNC), aventando-se possível mimetismo antigênico entre moléculas da pele e do SNC. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) participa da neurogênese, sinaptogênese e sobrevivência neuronal, e a sua diminuição sérica tem sido relacionada com DN. **Objetivo:** Quantificar o peptídeo BDNF e os anticorpos anti-BP180/230 na relação PB com DEM. **Material e Métodos:** Em estudo comparativo, 50 pacientes com PB, 50 com demência e 50 controles foram avaliados. A detecção dos anticorpos anti-BP180/P230 e do peptídeo BDNF foi determinada por ensaios ELISA. Imunofluorescência indireta (IFI) foi conduzida nas amostras de soro dos pacientes do grupo DEM e dos controles que apresentaram positividade para anti-BP180/230. **Resultados:** No grupo PB, a frequência de DN foi de 26%: DEM 16%, acidente vascular cerebral 6%, e epilepsia 4% - 5/8 (63%) pacientes apresentaram demência vascular e 3/8 (38%) demência por doença de Alzheimer. Positividade para anti-BP180/230 foi observada no grupo PB (74% e 40%, respectivamente), no grupo DEM (10% e 10%) e nos controles (14% e 0%). No grupo DEM, em 2/10 pacientes que apresentaram positividade para anti-BP180/230, a IFI evidenciou depósito de IgG e C3 no lado epidérmico da clivagem, configurando quadro subclínico de PB. A mediana do BDNF resultou menor no grupo DEM (25,41 pg/ml) comparado aos controles (38,21 pg/mL), e o grupo PB apresentou os menores valores de BDNF (16,88 pg/mL). Não houve correlação dos títulos de anticorpos anti-PB180/230 com a concentração do peptídeo BDNF no grupo PB. Os pacientes do grupo DEM foram alocados de acordo com a escala de demência – CDR1, CDR2 e CDR3; a mediana de BDNF do subgrupo CDR3 (23,37 pg/mL) foi inferior ao CDR1 (30,17 pg/ mL). Não houve diferença na concentração do BDNF segundo o tipo de demência. O grupo PB, quando estratificado em - com DEM, outras DN e sem DN, aqueles com associação com DEM apresentaram menores níveis de BDNF (9,1 pg/mL), comparados ao grupo sem DN e ao subgrupo CDR3 do grupo DEM. **Conclusão:** Marcadores para PB não são úteis para o diagnóstico de DEM. Valores sorológicos baixos de BDNF no grupo PB podem sugerir associação com DEM. BDNF pode ser utilizado como biomarcador de gravidade da DEM.

Palavras-chave: Penfigoide bolhoso, Doenças Neurológicas, Demência, BDNF, BP180, BP230.

Suporte Financeiro: FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/51729-2), e CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa.

ABSTRACT

JÚLIO, T.A.. BP180/230 serological markers and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the bullous pemphigoid and dementia relationship. 2016. 123f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introduction: Bullous pemphigoid (BP) is characterized by autoantibodies against the hemidesmosomal proteins BP180 and/or BP230, affects the elderly people and has been strongly associated with neurological disorders (ND), especially dementia. A possible antigenic mimicry hypothesis between the skin and the nervous system molecules is strong reasonable because BP peptides have also been identified in the central nervous system (CNS). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a role in the synaptogenesis, neurogenesis, and neuronal survival, and some studies have been correlated the decreased serum BDNF levels with ND. **The aim of this study** was to quantify the BDNF peptide and the anti-BP180 and anti-BP230 antibodies in the BP and DEM relationship. **Methods:** Anti-BP180/230 and BDNF quantification were analyzed in three groups: 50 patients with BP, 50 patients with dementia and 50 elderly individuals comprised a case-control study. Serum IgG anti-180/230, and the BDNF peptide were evaluated by using ELISA commercial kits; and immunofluorescence allied to salt split skin technique (SSS) was conducted in serum samples from patients of the dementia group and from controls who showed positive anti-BP180/230. **Results:** In BP group, 26% were associated with ND, and dementia was the most frequent (16%), followed by stroke (6%) and epilepsy (4%) - 5/8 (63%) patients showed vascular dementia and 3/8 (38%) patients presented dementia due to Alzheimer's disease. Anti-BP180/230 positivity was observed in BP group (74%, 40%, respectively), in dementia group (10%, 10%) and in controls (14%, 0%). In 2/10 patients of the dementia group with positive anti-BP180/230, IIF showed IgG and C3 deposition in the epidermal side of cleavage, configuring a subclinical BP dermatosis. The medians of BDNF resulted lower in the patients of the dementia group (25.41 pg/mL) compared with controls (38.21 pg/mL), and the BP group presented the lowest BDNF values (16.88 pg/mL). There was no correlation between the anti-BP180/230 antibodies titres and the BDNF levels in BP group. There was no difference of BDNF levels accordingly with the clinical type of dementia in the dementia group. Patients of the dementia group were sub grouped accordingly with the clinical dementia severity – CDR1, CDR2 and CDR3 – being the median of BDNF in CDR3 (23.37 pg/mL) lower than in CDR1 (30.17 pg/mL) subgroup. BP group had lower levels of BDNF compared to CDR3 subgroup. BP patients when stratified with dementia, other ND and without ND, those with association with dementia presented the lowest levels of BDNF (9.1 pg/mL) compared to the PB patients without DN and to the CDR3 subgroup. **Conclusion:** BP biomarkers are not useful for the diagnosis of dementia. Low BDNF levels seen in BP patients may suggest an association with dementia. BDNF may be used as a biomarker of severity of dementia.

Keywords: Bullous Pemphigoid, BDNF, Neurological Disease, Dementia, BDNF, BP180, BP230.

Financial support: FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/51729-2), e CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Vias patogênicas do PB. A via mais comum envolve o reconhecimento da IgG anti-BP180 à proteína transmembrana BP180, com ativação do complemento, que promove a degranulação dos mastócitos e a atração dos neutrófilos para a zona da membrana basal (ZMB). Nas demais vias não é observada a ativação do complemento. Observar a molécula IgE na superfície dos mastócitos, ao reconhecer o peptídeo extracelular BP180; e também ao reconhecer a exposição do peptídeo BP230, que é intracelular, após a injúria da ZMB por neutrófilos (Imagem: HAMMERS, STANLEY, 2016).....34
- Figura 2** - Representação histológica da junção dermoepidérmica, mostrando os principais alvos dos autoanticorpos nos penfigoides, com destaque para as moléculas BP180 (domínio NC16A) e BP230 (adaptado de SCHMIDT, 2012).....36
- Figura 3** – Representação da síntese do peptídeo BDNF. O neurônio pré-sináptico secreta o glutamato na fenda sináptica, que se liga ao receptor NDMA e estimula o influxo de Ca^{2+} , promovendo a fosforilação da CREB que ativa a transcrição do pró-BDNF e posteriormente é convertido em BDNF (Imagem: R&DSsystem[®]).....39
- Figura 4** – Receptores de BDNF e suas vias de sinalização neurobiológicas. O pró-BDNF se liga ao receptor p75 podendo ativar duas vias distintas, desencadeando apoptose ou sobrevivência celular. O BDNF maduro se liga ao receptor TrkB ativando a fosforilação de resíduos de tirosina Y515 e Y816. O primeiro cria um local de

ligação para a proteína Shc e o segundo para a PLC γ . A PLC γ ativa a via PLC promovendo a sinaptogênese, enquanto que a Shc ativa a via MAPK que induz à neurogênese, e a via PI3K que promove a sobrevivência neuronal (Imagem: adaptado de COELHO et al., 2014).....40

Figura 5 – Cálculo realizado no ambiente OpenEpi®, para determinar o tamanho amostral da população de estudo deste projeto. O método Fleiss com correção contínua estimou como número mínimo necessário 48 casos e 48 controles.....46

Figura 6 – Alocação dos grupos: pacientes com penfigóide bolhoso (PB), com demência (DEM) e controles. Destaque para as subdivisões dos grupos PB e DEM.....51

Figura 7 – Frequência de doenças neurológicas (DN) nos pacientes com penfigoide bolhoso, diagnosticados no ambulatório de dermatoses bolhosas autoimunes da Divisão de Dermatologia, HC-FMRP/USP.....57

Figura 8 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ensaio ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL). Títulos de anti-BP180 no grupo PB resultaram mais elevados em relação aos dos grupos DEM e controle; títulos anti-BP230 no grupo PB resultaram mais elevados, em relação aos dos grupos DEM e controle. Os títulos foram semelhantes nos grupos DEM e controle. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana. Linha tracejada: *cutoff* para limiar de normalidade.....59

Figura 9 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ensaio ELISA nos subgrupos do PB. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana. Linha tracejada: *cutoff* para limiar de normalidade.....60

Figura 10 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ensaio ELISA nos subgrupos de demência. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana. Linha tracejada: *cutoff* para limiar de normalidade.....61

Figura 11 – IFI com pele de prepúcio humano como substrato, soro 1:10, e anti-IgG com FITC. **A:** Observar fluorescência linear na ZMB. **B:** pela técnica *Salt Split Skin*, observar fluorescência no teto da clivagem, e discretos focos no assoalho da clivagem; fluorescência compatível com penfigoide bolhoso (soro da paciente de no. 10) (tabela 6) (aumento de 40 xx).....64

Figura 12 - Quantificação sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL). Pacientes com PB apresentaram concentrações menores do peptídeo BDNF, comparados aos demais grupos. Pacientes do grupo DEM apresentaram concentrações menores de BDNF comparados ao grupo controle. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....65

Figura 13 - Quantificação sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos subgrupos de PB. As barras representam valores mínimos e máximos. Pacientes com PB com associação com DEM apresentam os menores níveis de BDNF ($p=0,0485$). O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....66

Figura 14 – Quantificação sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos subgrupos DEM. O subgrupo CDR3 apresentou níveis mais baixos de BDNF comparados aos do CDR1 ($p=0,0004$). As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....67

Figura 15 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo PB em relação ao gênero. Houve diferença significativa entre os gêneros feminino e masculino ($p<0,0001$) nos 3 grupos estudados. Porém, ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....68

Figura 16 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo PB em relação à idade. Para IgG anti-BP180: pacientes com PB apresentam títulos mais elevados de anticorpos segundo a idade ($p=0,0119$). Para IgG anti-BP230, $p=0,2282$69

Figura 17 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo DEM em relação à idade ($p>0,05$).....	70
Figura 18 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo CTL em relação à idade ($p>0,05$).....	70
Figura 19 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo PB, segundo o tempo de doença em meses. O grupo PB apresenta títulos mais elevados de anticorpos IgG anti-BP180 quanto menor o tempo de doença ($p=0,02$). Para IgG anti-BP230, $p=0,6103$	71
Figura 20 – Titulação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo penfigoide bolhoso (PB), segundo estar ou não em tratamento no momento da coleta do soro. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....	72
Figura 21 – Concentração sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL) segundo o gênero. Houve diferença significativa entre os gêneros feminino e masculino nos 3 grupos estudados ($p<0,0001$). Porém, ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....	73

Figura 22 – Níveis séricos de BDNF (pg/mL) por ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL) em relação à idade ($p>0,05$).....	73
Figura 23 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com o tempo de doença em meses no grupo PB ($r=0,0244$; $p=0,8663$).....	75
Figura 24 – Concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA no grupo PB segundo estar ou não em tratamento no momento da coleta do soro. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.....	76
Figura 25 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com título dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo penfigoide bolhoso (PB). Para anti-BP180: $p=0,7057$; para anti-BP230: $p=0,2891$	77
Figura 26 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo demência (DEM). Para anti-BP180: $p=0,1972$; para anti-BP230: $p=0,7178$	77
Figura 27 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo controle (CTL). Para anti-BP180: $p=0,5079$; para anti-BP230: $p=0,6456$	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão da literatura sobre biomarcadores de doenças neurológicas.....	99
Tabela 2. Revisão da literatura sobre associação do penfigoide bolhoso (PB) com desordens neurológicas.....	104
Tabela 3. Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL).....	49
Tabela 4. Locais de coleta das amostras de sangue dos pacientes em colaboração com o Prof. Dr. Julio Moriguti, responsável pelo Ambulatório de Demências, e como Prof. Dr. André Messias, responsável pelo Ambulatório de Catarata.....	50
Tabela 5. Distribuição dos resultados qualitativos de teste ELISA para anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle.....	58
Tabela 6. Distribuição dos resultados da detecção de anticorpos séricos anti-BP180 e anti-BP230 e da IFI em amostras de soro de pacientes dos grupos demência (DEM) e controle (CTL).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC:	Acidente cerebrovascular
BA6:	Área de Brodmann do córtex cerebral
BA7:	Área de Brodmann do córtex cerebral
BP:	<i>Bullous Pemphigoid</i>
BPAG1:	Antígeno 230 do Penfigoide Bolhoso
BPAG2:	Antígeno 180 do Penfigoide Bolhoso
BP-180:	Antígeno 180 do Penfigoide Bolhoso
BP-230:	Antígeno 230 do Penfigoide Bolhoso
BDNF:	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CTL:	Grupo Controle deste estudo
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Colágeno XVII:	Tipo de colágeno expresso no penfigoide bolhoso
DA:	Doença de Alzheimer
DEM:	Demência
DN:	Doença neurológica
DO:	Densidade óptica medida por absorbância em espectrofotômetro
DP:	Doença de Parkinson
DV:	Demência Vascular
EDTA:	Anticoagulante Ácido Etilenedinitrilotetracético
ELISA:	Ensaio Imunoenzimático, do inglês “Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay”
F:	Gênero Feminino
FAPESP:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína
FMRP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCRP-FMRP-USP:	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
IC 95%:	Intervalo de confiança no nível 95%
IFD:	Imunofluorescência Direta
IFI:	Imunofluorescência indireta
IgG:	Imunoglobulina do isotipo G
IL:	Interleucinas
kDa:	Quilodaltons (medida de peso para proteínas)
LPP:	Líquen Plano Penfigoide
M:	Gênero Masculino
N:	Não
NA:	Não aplicável ao grupo/ Não avaliado
NC16A:	Epítopo da proteína BP180
ND:	Dados não disponíveis para análise
PB:	Penfigoide Bolhoso
PBS:	Tampão Bicarbonato-Fosfato pH=7,0 ou inglês “ <i>Phosphate buffered saline</i> ”
PG:	Penfigoide Gestacional
PMM:	Penfigoide das Membranas Mucosas
<i>r</i> :	coeficiente de correlação de <i>Spearman</i>
SD:	(<i>Standard derivation</i>) desvio-padrão
SSS:	<i>Salt Split Skin</i> (técnica)
TA:	Temperatura ambiente

TMB/H ₂ O ₂ :	Tetrametilbenzidina conjugada com Peróxido de Hidrogênio
TrkB:	Receptor neuronal do BDNF
UR/mL:	Unidades de valor por mL de amostra testada
UR/mL:	Unidades Relativas de valor por mL de amostra testada
ZMB:	Zona da membrana basal

SÍMBOLOS

μl :	microlitro
H_2SO_4 :	Solução de ácido sulfúrico a 0,5 Molar
mL:	mililitro
pg:	picograma
nm:	nanômetros – comprimento de onda do espectrofotômetro
$^{\circ}\text{C}$:	Graus Celsius
%:	porcentagem
vs.:	versus
p:	valor p
γ :	<i>Gamma</i>
*:	Asterisco, utilizado para indicar diferença significativa entre os grupos
δ :	Delta, utilizado para indicar diferença significativa entre os grupos
Φ :	Fi, utilizado para indicar ausência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1 – PENFIGOIDES	31
2.1.2 – Penfigoide bolhoso	31
2.2 - EPIDEMIOLOGIA	32
2.3 – ETIOLOGIA DO PENFIGOIDE BOLHOSO	33
2.4 – ALVOS ANTIGÊNICOS	36
2.5 – DOENÇAS NEUROLÓGICAS E O PENFIGOIDE BOLHOSO	38
2.6 – FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO	39
2.6.1 – Síntese e transcrição do BDNF.....	40
2.6.2 – Receptores e vias de sinalização.....	42
2.6.3 – BDNF como biomarcador de doenças neurodegenerativas	43
2.6.4 – Fatores que influenciam na concentração sérica de BDNF.....	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 - OBJETIVO GERAL	48
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 - ASPECTOS ÉTICOS	50
4.2 – CÁLCULO AMOSTRAL	50
4.3 - CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	52
4.4 – COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS	55
4.5 - ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS BP180 E BP230	56

4.6 - ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BDNF ENDÓGENO	58
4.7 – IFI-SSS PARA DETECÇÃO DE IGG E C3 EM AMOSTRAS SOROLÓGICAS	59
4.8 - ESTUDO ESTATÍSTICO.....	60
4.9 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO	60
5. RESULTADOS	61
5.1 – FREQUÊNCIA DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS (DN) EM PACIENTES COM PB ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE DERMATOSES AUTOIMUNES, HC-FMRP-USP	62
5.2 – DETECÇÃO QUALITATIVA DOS ANTICORPOS IGG CONTRA PROTEÍNAS HEMIDESMOSSOMAS BP180 E BP230	63
5.3 - QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IgG ANTI-BP180 E ANTI-BP230.....	64
5.3.1 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 nos subgrupos PB	65
5.3.2 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 nos subgrupos DEM.....	66
5.4 - DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E C3 CONTRA PEPTÍDEOS HEMIDESMOSSOMAS POR IFI (SSS) NOS GRUPOS DEM E CONTROLE	67
5.5 - QUANTIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO BDNF.....	70
5.5.1 - Quantificação do peptídeo BDNF nos subgrupos PB	71
5.5.2 - Quantificação do peptídeo BDNF nos subgrupos DEM.....	73
5.6 - CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS	74
5.6.1 – Relação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com o gênero nos grupos de estudo.....	75
5.6.2 – Correlação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com a idade nos grupos de estudo.....	76
5.6.3 – Correlação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com o tempo de doença no grupo PB	78

5.6.4 – Relação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com o tratamento no grupo PB	78
5.6.5 – Relação da concentração sérica de BDNF com o gênero nos grupos de estudo	79
5.6.6 – Correlação da concentração sérica de BDNF com a idade nos grupos de estudo	80
5.6.7 – Correlação da concentração sérica de BDNF com o tempo de doença no grupo PB	81
5.6.8 – Relação da concentração sérica de BDNF com o tratamento no grupo PB	82
5.6.9 – Correlação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com a concentração sérica de BDNF nos grupos de estudo	83
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÃO	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
9. ANEXOS	109
Anexo 1 - Tabela completa referente à revisão da literatura dos biomarcadores sorológicos para doenças neurológicas	110
ANEXO 2 - Tabela completa referente à revisão da literatura da associação do pb com doenças neurológicas	115
ANEXO 3 - Termo de aprovação do comitê de ética humano	118
ANEXO 4 – Escala clínica da demência	122
ANEXO 5 – Modelo da ficha do mini exame do estado mental utilizada para avaliação mental dos pacientes do grupo demência e controle	123

1. INTRODUÇÃO

O penfigoide bolhoso (PB) se insere no grupo das dermatoses bolhosas autoimunes, caracterizado clinicamente por bolhas tensas, de conteúdo citrino ou hemorrágico, podendo ser generalizadas e afetar membranas mucosas. Ao exame histopatológico, caracteriza-se por bolhas subepidérmicas, com infiltrado linfocitário, neutrofílico e eosinofílico na derme papilar. A patogênese do PB está aliada à produção de autoanticorpos da classe IgG, e mais raramente IgA, contra os antígenos BP180 (colágeno XVII) e BP230, localizados nos hemidesmossomos dos queratinócitos. Essas moléculas são componentes de proteínas da placa intracelular e do domínio extracelular do hemidesmossomo, respectivamente, localizados na zona da membrana basal (ZMB). O diagnóstico é comprovado por imunofluorescência direta (IFD) ou imunofluorescência indireta (IFI), quando se visualiza depósito linear de anti-C3 e ou de anti-IgG na ZMB (SCHMIDT; DELLA TORRE; BORRADORI, 2012).

Relatos epidemiológicos em populações europeias e Norte-americanas mostram que a incidência de PB vem aumentando nos últimos anos, principalmente entre indivíduos idosos, sem predileção étnica, racial ou de sexo (FÖRSTI et al., 2014; BRICK et al., 2014; SCHMIDT; ZILLIKENS, 2013).

O PB vem sendo relacionado com diversas doenças neurológicas (DN) ao longo das duas últimas décadas (CHOSIDOW et al., 2000; KIBSGAARD et al., 2015; FOUREUR et al., 2001), sendo a Demência (DEM) senil e a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson, acidente vascular cerebral (AVC), esclerose múltipla e epilepsia aquelas mais frequentemente associadas (LANGAN; GROVES; WEST, 2011; TEIXEIRA et al., 2014). A associação do PB com DN é reforçada pela expressão de proteínas comuns em ambos os tipos de tecidos envolvidos – pele e sistema nervoso central (CLAUDEPIERRE et al., 2005; CORDEL et al., 2007; NEAU et al., 2014).

Casas-De-La-Asunción et al., 2014, em estudo caso-controle com 44 pacientes com PB, relataram prevalência significativa (O.R. 6,70; 95% IC) de DN nos pacientes estudados. Mais recentemente, Kwan et al., 2015, em estudo caso-controle retrospectivo com 43 pacientes com PB, relataram prevalência aumentada de DN (44,2%) entre os pacientes do grupo PB.

No Brasil, Tarazona et al., 2015, revisaram 25 pacientes com PB, nove deles apresentavam comprometimento neurológico, sendo DEM e AVC os mais prevalentes.

A relação de DN em pacientes com PB procura associar as proteínas BP180 e BP230 como marcadores patogênicos em doenças do sistema nervoso. Da mesma forma, marcadores de DN poderiam também ser utilizados para auxiliar na elucidação da associação das duas doenças.

Embora não haja consenso de teste padrão ouro ou de marcador sorológico validado para o diagnóstico de DEM, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) vem sendo descrito como um biomarcador que abrange o maior número de doenças neurodegenerativas (vide revisão na **Tabela 1**, Anexo 1) (LASKE et al., 2007; VENTRIGLIA et al., 2013). O BDNF é a neurotrofina mais amplamente expressa e distribuída no cérebro. Este peptídeo é responsável por regular a sobrevivência, o crescimento e a plasticidade sináptica de diversos neurônios distribuídos no tecido cerebral, em especial nas regiões que são mais afetadas pela DA: o hipocampo, córtex e os neurônios colinérgicos (DINIZ; TEIXEIRA, 2011; LU et al., 2013; WONG, 2013).

A associação de DN com mecanismos de autoimunidade vem sendo cada vez mais discutida, justificando o estudo da quantificação do peptídeo BDNF e dos anticorpos anti-BP180 e anti-BP230 na relação PB com DEM. Devido à ação moduladora da neuroplasticidade em processos cognitivos, o BDNF foi escolhido para o presente estudo. Os

resultados preencherão uma lacuna sobre a relação do PB com as DN, em especial com a DEM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – PENFIGOIDES

O termo penfigoide (*pemphigodes* do grego = que se assemelha ao pênfigo) descreve uma classe das doenças bolhosas autoimunes incomuns. Tem como característica clínica presença de lesões mucocutâneas inflamatórias, bolhosas e/ou erosivas. A histologia apresenta clivagem subepitelial e depósitos de IgG e/ou complemento na zona da membrana basal da epiderme. O local de formação de bolhas e os autoanticorpos circulantes distinguem os penfigoides dos pênfigos (BAUM et al., 2014; KERSHENOVICH, HODAK E MIMOUNI, 2014).

Há seis tipos de penfigoides: Penfigoide das membranas mucosas (PMM); Penfigoide Gestacional (PG); Penfigoide anti-laminina gama-1; Líquen plano penfigoide (LPP); Penfigoide de *Brunsting-Perry* e o Penfigoide bolhoso (PB) - dermatose abordada neste trabalho. Eles se diferem entre si pela presença de anticorpos contra diferentes componentes estruturais pertencentes à união dermoepidérmica, a qual é responsável pela junção do citoesqueleto dos queratinócitos basais com a matriz extracelular da derme.

2.1.2 – Penfigoide Bolhoso

O primeiro relato diferenciando o PB das demais dermatoses bolhosas ocorreu em 1953, por Lever, que atribuiu a presença típica de bolha subepidérmica como característica exclusiva do PB. Na década seguinte, Beutner, Jordan (1964) demonstraram por imunofluorescência direta (IFD) e imunofluorescência indireta (IFI) que pacientes acometidos pelo PB apresentavam autoanticorpos circulantes contra a junção dermoepidérmica.

Caracteriza-se por lesões urticadas e pruriginosas, e posteriormente pela combinação de bolhas tensas subepidérmicas, de conteúdo citrino ou hemorrágico. Porém, nos estágios iniciais, antes do desenvolvimento das bolhas, o PB pode ser precedido por várias semanas ou até meses por manifestações inespecíficas, como prurido intenso, escoriações e/ou lesões urticariformes, o que dificulta o diagnóstico (SCHMIDT; ZILLIKENS, 2013).

As bolhas podem ser generalizadas e afetam principalmente as áreas das dobras dos membros, pescoço e abdome, e permanecem por vários dias até se romperem deixando lesões erodidas e crostas. As membranas mucosas também podem ser acometidas, sendo as lesões orais as mais frequentes, em 10 a 20% dos casos, enquanto que as outras mucosas são raramente afetadas (COZZANI et al., 2015; KERSHENOVICH; HODAK; MIMOUNI, 2014; SCHMIDT; DELLA TORRE; BORRADORI, 2012).

Ao contrário do que observamos nos pênfigos, o sinal de Nikolsky no PB é negativo. A IFI associada ao *Salt Split Skin* evidencia característica típica e específica do PB - presença de depósito linear de IgG no teto da clivagem, sendo esta técnica utilizada para o diagnóstico diferencial do PB com a Epidermólise Bolhosa Adquirida (GAMMON et al., 1984).

2.2 - EPIDEMIOLOGIA

O PB não apresenta predileção racial, ocorre de forma semelhante em ambos os sexos e apresenta um pico de incidência na sétima década de vida (ALPSOY; AKMAN-KARAKAS; UZUN, 2015; BRICK et al., 2014; PARKER; MACKELFRESH, 2011), sendo

raro o acometimento em crianças (MARTINEZ-DE PABLO et al., 2007; MINTZ; MOREL, 2011; OSAWA et al., 2014), e durante a meia idade (ZANELLA et al., 2011).

Alguns estudos de incidência, realizados principalmente na Europa, permitem estimar que a incidência do PB varia entre 7 a 43 casos por milhão de habitantes por ano, o que fortalece a classificação do PB como um grupo de dermatoses raras (MARAZZA et al., 2009; SCHMIDT, DELLA TORRE, BORRADORI, 2012).

Porém, alguns estudos retrospectivos sugerem que a incidência do PB vem aumentando nos últimos anos, com taxa de 12 a 43 novos casos por milhão de habitantes (FÖRSTI et al., 2014; KASPERKIEWICZ; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2012; BRICK et al., 2014; LANGAN et al., 2008), e sua incidência tende a aumentar em consequência do envelhecimento da população.

Um dos maiores aumentos relatados decorre de um estudo retrospectivo francês que mostrou taxa de incidência anual de PB entre 2000 e 2005 (22 casos por milhão de habitantes por ano) três vezes maior do que a taxa de incidência estimada entre 1986 e 1992 (JOLY et al., 2012).

No Brasil ainda não existem dados epidemiológicos de PB, apenas relatos de séries de casos ou descrição de casos clínicos.

2.3 – ETIPOATOGENESE DO PENFIGOIDE BOLHOSO

Os mecanismos patogênicos do PB ainda não são completamente compreendidos, mas, muito provavelmente, envolvem danos mediados por autoanticorpos à zona da membrana basal (ZMB) (KERSHENOVICH; HODAK; MIMOUNI, 2014; LO SCHIAVO et al., 2013; NISHIE, 2014). Medicamentos podem representar fator desencadeante do PB,

dentre os quais se destacam os diuréticos, analgésicos, antibióticos, penicilinaminas, captopril, furosemidas e neurolépticos (BASTUJI-GARIN et al., 2011). Fatores físicos, como exposição à luz ultravioleta, radioterapia, traumas e queimaduras também podem induzir ou exacerbar o PB (LO SCHIAVO et al., 2013; SCHMIDT; DELLA TORRE; BORRADORI, 2012). As infecções, principalmente aquelas causadas pelo herpes vírus humano (citomegalovírus, Epstein-Barr e HHV-6), também têm sido citadas como possíveis fatores que estimulam o aparecimento do PB em alguns pacientes (LO SCHIAVO et al., 2013).

Até o momento não há consenso sobre o mecanismo patogênico envolvendo o desencadeamento da formação dos anticorpos anti-BP no PB, mas várias hipóteses têm sido propostas. Recentemente Danescu et al. (2016) propuseram a hipótese de que os pacientes com PB, mesmo antes do surgimento da doença, já apresentam baixos títulos de autoanticorpos anti-BP, e que esses anticorpos não seriam patogênicos e não levariam ao desencadeamento do PB por si só. Quando os pacientes são expostos a fatores físicos, ocorre a destruição do tecido com consequente desencadeamento de uma cascata de estímulos pró-inflamatórios. O fator de crescimento endotelial vascular, uma das citocinas liberadas durante a reparação dos tecidos, aumenta a permeabilidade vascular, levando ao aumento dos autoanticorpos anti-BP circulantes.

Um trabalho de revisão realizado recentemente por Hammers e Stanley (2016), mostra diferentes mecanismos pelos quais os autoanticorpos promovem o destacamento da junção derme-epiderme com consequente formação da bolha subepidérmica. O mecanismo mais comumente descrito envolve o reconhecimento da proteína BP180 pelo anticorpo da classe IgG, na ZMB. Com isso, o complemento é ativado pela via clássica, promovendo a degranulação de mastócitos e recrutamento de neutrófilos para a ZMB, como mostra a Figura 1. Os neutrófilos promovem a clivagem da proteína BP180 comprometendo a adesão das

células à ZMB, que resulta na separação entre a epiderme e a derme na pele e/ou na separação do epitélio com o sub-epitélio nas membranas mucosas, ocasionando a formação de lesões cutâneas e/ou mucosas.

Um outro mecanismo sugere que o anticorpo anti-BP180 IgG, sob algumas circunstâncias, é capaz de induzir a formação da bolha subepidérmica sem ativação do complemento. O anti-BP180 IgG internaliza a proteína BP180, provavelmente por macropinocitose, e com isso os queratinócitos secretam IL-6 e IL-8 que promovem a ativação e recrutamento dos neutrófilos para a ZMB, comprometendo a adesão celular.

O último mecanismo proposto envolve a imunoglobulina da classe IgE, pois sabe-se que mais de 70% dos pacientes com PB apresentam níveis elevados de IgE, e essa imunoglobulina age contra ambas proteínas, BP180 e BP230. Neste mecanismo, a IgE não se encontra ligada à ZMB, mas sim à superfície dos mastócitos da derme papilar e reticular. Aqui também não observamos a ativação do complemento, a IgE anti-BP180 ou anti-BP230 internaliza a proteína (BP180 ou BP230) e promove a degranulação dos mastócitos que recrutam os neutrófilos para a ZMB e desencadeia a formação da bolha subepidérmica.

Figura 1 - Vias patogênicas do PB. A via mais comum envolve o reconhecimento da IgG anti-BP180 à proteína transmembrana BP180, com ativação do complemento, que promove a degranulação dos mastócitos e a atração dos neutrófilos para a zona da membrana basal (ZMB). Nas demais vias não é observada a ativação do complemento. Observar a molécula IgE na superfície dos mastócitos, ao reconhecer o peptídeo extracelular BP180; e também ao reconhecer a exposição do peptídeo BP230, que é intracelular, após a injúria da ZMB por neutrófilos (Imagem: HAMMERS & STANLEY, 2016; disponível em <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol>).

2.4 – ALVOS ANTIGÊNICOS

A bolha subepidérmica, uma das principais características do PB, é ocasionada por reconhecimento por autoanticorpos de proteínas localizadas nos hemidesmossomos (Figura 2). Estes, por sua vez, em sinergia com os desmossomos e junções de ancoragem promovem a adesão das células epiteliais à lâmina basal. Estruturalmente, o hemidesmossomo é constituído por uma placa de ligação citosólica, na qual estão ancorados os filamentos

intermediários, a plectina e uma das proteínas que é alvo antigênico no PB, a BP230. A outra porção do hemidesmosomo fica restrita ao meio extracelular, e tem em sua constituição a integrina $\alpha 6\beta 4$ e a proteína BP180, outro alvo antigênico do PB (KERSHENOVICH; HODAK; MIMOUNI, 2014; LJUBOJEVIC; LIPOZENČIĆ, 2012; SCHMIDT; ZILLIKENS, 2013).

O BP230, uma proteína de 230 kDa, é um dos componentes proteicos da placa hemidesmosômica intracelular e é também referido como antígeno do BP tipo 1 (BPAG1) (Figura 2). A proteína BP230 possui um domínio globular na sua extremidade C-terminal, sendo esse domínio o principal local de ancoragem do anticorpo anti-BP230. Esses anticorpos são detectados em cerca de 60 a 70% dos pacientes com PB (KASPERKIEWICZ; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2012; SCHMIDT; ZILLIKENS, 2010), e os níveis séricos de anti-BP230 não apresentam correlação coerente com a atividade da doença (CHARNEUX et al., 2011; ROUSSEL et al., 2011).

Outro antígeno do PB, o BP180, é uma glicoproteína transmembrana de 180kDa que também é designada de antígeno do BP tipo 2 (BPAG2) ou colágeno tipo XVII. A região imunodominante do BP180 é a porção denominada *non-collagenous* 16A (NC16A), onde os anticorpos anti-BP180 se ligam (NISHIE, 2014; UJIIE; NISHIE; SHIMIZU, 2011). Esses anticorpos são detectados em cerca de 80 a 90% dos pacientes afetados (ISHIURA et al., 2008; MARIOTTI et al., 2004; SAKUMA-OYAMA et al., 2004). Também pode haver produção de anticorpos dirigidos contra outros epítomos do BP180, como a extremidade C-terminal, os quais têm sido associados com manifestações clínicas do PB com comprometimento das mucosas (DI ZENZO et al., 2004; HOFMANN et al., 2002).

Figura 2 - Representação histológica da junção dermoepidérmica, mostrando os principais alvos dos autoanticorpos nos penfigoide, com destaque para as moléculas BP180 (domínio NC16A) e BP230 (Imagem: SCHMIDT *et al.*, 2012; disponível em: [http://middleeast.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS01406736\(12\)61140-4/fulltext](http://middleeast.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS01406736(12)61140-4/fulltext)).

2.5 – DOENÇAS NEUROLÓGICAS E O PENFIGOIDE BOLHOSO

Nas últimas décadas, a alta prevalência de DN em pacientes geriátricos com PB suscita indagações científicas. São vários os relatos de estudos discutindo e investigando essa associação. A **Tabela 2** mostra a revisão dos trabalhos epidemiológicos que associam PB às DN (Para consultar a tabela completa da revisão vide Anexo 2).

Neau et al., em 2014, discorrem sobre justificativas para a conexão das DN com o PB: (1) tanto o tecido epitelial quanto o tecido neuronal possuem a mesma origem embriológica, o folheto ectodérmico; (2) essa linhagem embrionária proveniente de um mesmo precursor sugere que algumas isoformas moleculares podem apresentar funções análogas em ambos os tecidos.

Claudepierre et al., 2005, partindo da premissa da origem embrionária em comum para a pele e tecido constituinte do SNC, confirmaram a expressão das proteínas hemidesmosomais - o colágeno XVII (BP180) e o BPAG1 (BP230) - nos neurônios do sistema nervoso central. Soros de pacientes idosos com PB portadores de DN reconhecem a proteína BP230 no extrato cerebral de rato (Li et al., 2009). Ainda, atribuindo a associação do PB e DN a proteínas análogas, soro desses pacientes também reagia contra a mesma proteína BP230, porém, agora em experimentos com tecido cerebral humano (CHEN et al., 2011).

Mais recentemente, Messingham et al. (2015) mostraram que 1/3 dos pacientes com Doença de Parkinson (DP) possuem autoanticorpos contra o colágeno XVII (BP180), os quais se ligam aos neurônios tirosina hidroxilase positivos, que são neurônios dopaminérgicos.

2.6 – FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um peptídeo solúvel de 27kDa, pertencente à superfamília das neurotrofinas, produzido principalmente pelas células da glia e núcleos neuronais. O BDNF foi o segundo fator neurotrófico a ter sua estrutura caracterizada, depois do fator de crescimento neural (NGF) (ADACHI et al., 2014; BALARATNASINGAM, JANCA, 2012; LASKE et al., 2007).

O BDNF é o fator de crescimento mais amplamente distribuído no SNC, sendo encontrado em grandes concentrações no hipocampo, hipotálamo, córtex e cerebelo de humanos (DINIZ; TEIXEIRA, 2011; WEINSTEIN et al., 2014). O BDNF exerce função essencial na neurobiologia, pois na fase de desenvolvimento dos mamíferos, o BDNF atua na neurogênese, além de mediar o processo de sobrevivência e apoptose neuronal. Ainda no período de desenvolvimento, o BDNF também participa no processo de sinaptogênese (NUMAKAWA et al., 2010). Já na fase adulta, o BDNF atua na consolidação da memória, e também está envolvido com a plasticidade dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico e glutamatérgico. Além disso, exerce papel protetor - os neurônios do encéfalo frontal recebem proteção contra ataques isquêmicos, enquanto que os neurônios motores são protegidos contra os processos de morte induzida (POST, 2007; WEINSTEIN et al., 2014).

2.6.1 – Síntese e transcrição do BDNF

A síntese do BDNF acontece nos corpos celulares dos neurônios sensoriais primários, e sua transcrição é regulada principalmente pela proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB) (CHALOVICH et al., 2006). Para ocorrer a ativação da transcrição do gene BDNF, o fator de transcrição CREB precisa ser fosforilado a pCREB para ser translocado ao núcleo e iniciar esse processo (FINKBEINER, 2005).

A fosforilação da proteína CREB é mediada pelo influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) para o interior da célula. Através do impulso nervoso o glutamato, um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso, é liberado no neurônio pré-sináptico e se liga nos receptores NMDAr (receptores N-methyl-D- aspartato) na célula pós-sináptica, provocando o influxo de Ca^{2+} , como mostra a Figura 3. Os íons Ca^{2+} desencadeiam a fosforilação do CREB e

consequentemente, ativa a transcrição do BDNF (TAO et al., 1998). Uma vez sintetizado e processado, o mRNA é traduzido em uma forma precursora da proteína, chamada pró-BDNF, o qual pode ser clivado proteoliticamente no meio intracelular por ação de uma enzima chamada plasmina e secretado como BDNF maduro (mBDNF), ou pode ser secretado como pró-BDNF e ser clivado por proteases extracelulares (PANG et al, 2004; YANG et al., 2009).

Figura 3 – Representação da síntese de BDNF. O neurônio pré-sináptico secreta o glutamato na fenda sináptica, que se liga ao receptor NDMA e estimula o influxo de Ca^{2+} , promovendo a fosforilação da CREB que ativa a transcrição do pró-BDNF e posteriormente é convertido em BDNF (Imagem disponível em: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/synaptic-bdnf-connecting-physiology-therapy>).

2.6.2 – Receptores e vias de sinalização

O pró-BDNF e mBDNF se ligam a receptores distintos promovendo a ativação de distintas vias de sinalização e exercendo influência na função neuronal. O mBDNF se liga ao receptor tirosina cinase B (TrkB), enquanto que o pró-BDNF se liga ao receptor pan-neurotrofina 75 (p75), assim, essas diferentes formas promovem ações antagônicas, tanto na morfologia quanto na fisiologia neuronais.

A ligação de alta afinidade entre mBDNF e Trkb ativa, principalmente, três vias de sinalização: fosfolipase C γ (PLC γ), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e cinase de proteína ativada por mitógeno (MAPK). Separadamente, essas vias de sinalização ativam cascatas de reações distintas, mas que resultam na neurogênese, sinaptogênese e sobrevivência celular, como mostra a Figura 4 (ARÉVALO; WU, 2006; WONG, 2013). Entretanto, a ligação de baixa afinidade do pro-BDNF ao receptor p75 promove a ativação da via c-Jun N-terminal cinase (JNK) ou fator nuclear kappa B (NF-Kb) desencadeando a apoptose ou sobrevivência celular, respectivamente (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010).

Figura 4 – Receptores de BDNF e suas vias de sinalização neurobiológicas. O pró-BDNF se liga ao receptor p75 podendo ativar duas vias distintas, desencadeando apoptose ou sobrevivência celular. O BDNF maduro se liga ao receptor TrkB ativando a fosforilação de resíduos de tirosina Y515 e Y816. O primeiro cria um local de ligação para a proteína Shc e o segundo, para a PLCγ. A PLCγ ativa a via PLC promovendo a sinaptogênese, enquanto que a Shc ativa a via MAPK que induz à neurogênese, e a via PI3K que promove a sobrevivência neuronal (Imagem: adaptado de COELHO et al., 2014).

2.6.3 – BDNF como biomarcador de doenças neurodegenerativas

Foi demonstrado que o BDNF pode ser encontrado tanto no soro, quanto no plasma sanguíneos, sendo a sua concentração sérica maior do que a plasmática (TRAJKOVSKA et al., 2007). O BDNF atravessa a barreira hematoencefálica em ambas as direções, tanto do cérebro para a periferia, quanto da periferia para o cérebro, e seus níveis séricos apresentam forte correlação com o BDNF no líquido cefalorraquidiano ($r=0,8$) (KAREGE et al., 2005; PAN et al., 1998).

Assim, os níveis séricos de BDNF podem ser utilizados como biomarcadores biológicos de prejuízos à memória e função cognitiva geral, sendo que a multiplicidade de atribuições do BDNF no SNC despertou inúmeras pesquisas associando os níveis séricos do BDNF à fisiopatologia de diferentes doenças degenerativas, tais como a doença de Parkinson (ADACHI et al., 2014; VENTRIGLIA et al., 2013), doença de Alzheimer (DINIZ; TEIXEIRA, 2011; KEIFER; ZHENG; AMBIGAPATHY et al., 2015; VENTRIGLIA et al., 2013; YASUTAKE et al., 2006) e demência vascular (ADACHI et al., 2014; VENTRIGLIA et al., 2013; YASUTAKE et al., 2006).

Diversos estudos buscaram associar o papel do BDNF com indivíduos portadores da DA. Nestes pacientes, a expressão dos receptores de BDNF - TrkB, estava diminuída tanto na região do hipocampo quanto no córtex frontal e temporal (ALLEN; WILCOCK; DAWBARN, 1999; CONNOR et al., 1996; DEVI; OHNO, 2015).

Erickson et al. (2011), em 142 indivíduos livres de demência, com idade entre 59 e 81 anos, relataram a relação entre níveis séricos reduzidos de BDNF e volumes menores de hipocampo, bem como a memória mais pobre.

Um estudo de base populacional italiana, com 266 portadores de DA e 91 portadores de demência vascular (DV), constatou que os grupos DA e DV apresentavam níveis séricos diminuídos de BDNF quando comparados com o grupo controle (VENTRIGLIA et al., 2013).

Durante o estudo de Framingham, Weinstein et al. (2014) acompanharam por 10 anos 2131 pacientes livres de demência, e observaram que 144 pacientes desenvolveram DEM, dos quais 117 receberam diagnóstico de DA, e que os níveis séricos de BDNF nesses pacientes estavam reduzidos.

Recentemente, Michalski et al. (2015) conduziram, no sul da Califórnia, um estudo longitudinal, *post mortem*, envolvendo 51 pacientes, com idade superior a 90 anos. Esses pacientes foram divididos em 4 grupos: (i) sem demência e sem DA, (ii) sem demência e com DA, (iii) com demência e sem DA e (iv) com demência e com DA. A área de Brodmann (BA7) e (BA9) foi escolhida para realizar a extração do peptídeo BDNF, visto que essa região é uma das primeiras a ser afetada na DA. Como resultado, obtiveram concentrações de BDNF diminuídas no extrato cerebral de pacientes com demência.

2.6.4 – Fatores que influenciam na concentração sérica de BDNF

Além dos níveis de BDNF circulantes estarem alterados nas doenças neurodegenerativas, alguns fatores podem influenciar na produção e secreção desse peptídeo. Um estudo prospectivo realizado em 140 adultos saudáveis teve como objetivo de verificar o impacto da idade, gênero e peso nos níveis de BDNF, e verificou-se que os níveis de BDNF diminuía significativamente com o aumento da idade ou do peso. Já para o gênero não houve diferença significativa (LOMMATZCH et al, 2005).

O polimorfismo funcional no gene do BDNF em seres humanos, denominado rs6265, induz a substituição do aminoácido valina para metionina no códon 66 (Val66Met). Segundo Egan et al. (2003) o alelo metionina altera negativamente a regulação da secreção e do tráfego intracelular de BDNF e está associado com diminuição de volumes hipocâmpais e episódios de memória improdutiva.

Em um estudo longitudinal, 54 idosos sem diagnóstico de demência foram avaliados por um período de 10 anos e os resultados mostraram alterações na associação genética entre o BDNF e a cognição. Em um teste de função cognitiva, os idosos portadores

do homozigoto valina obtiveram melhores resultados quando comparados com os carregadores do alelo metionina (ERICKSON et al., 2003).

Estudos em modelos animais mostram que a restrição calórica aumenta os níveis de BDNF (LEE et al., 2002; KOIZUMI et al., 2006). Evidências também mostram uma relação clara entre a intensidade de atividade física e o aumento sérico de BDNF (VAYNMAN.YING, GOMEZ, 2003).

A diabetes tipo 2 vem sendo descrita como um fator que pode predispor o indivíduo a apresentar diminuição dos níveis séricos de BDNF, sugerindo que ocorre uma regulação da resistência a insulina por mecanismos mediados por este peptídeo (PEDERSEN et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Quantificar o peptídeo BDNF e os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230 na relação PB com DEM.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Determinar a frequência de DN na amostragem de pacientes com PB atendidos no ambulatório de dermatoses autoimunes (ADAI) do HC-FMRP-USP;
- (ii) Determinar a soroprevalência dos anticorpos IgG contra anti-BP180 e anti-BP230 nos grupos PB, DEM e controle;
- (iii) Verificar se as amostras de soro dos pacientes dos grupos DEM e controle reconhecem proteínas da ZMB da pele humana.
- (iv) Quantificar o peptídeo BDNF nos grupos PB, DEM e controle;
- (v) Correlacionar títulos de anticorpos anti-BP180 e anti-BP230 com a concentração do peptídeo BDNF nos grupos PB, DEM e controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo corresponde ao subprojeto IX do projeto temático FAPESP (2010/51729-2) “Relação dos fatores imunogenéticos e ambientais na etiopatogênese dos pênfigos em amostragem brasileira”, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCRP-FMRP-USP), protocolo de número 051174/2015, em 7 de dezembro de 2015 (Anexo 3).

Todos os participantes, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pós-informação, tiveram uma amostra de sangue coletada por punção venosa. Foram excluídos do estudo aqueles que não aceitaram assinar o TCLE.

4.2 – CÁLCULO AMOSTRAL

Não existem dados sobre a manifestação do PB poder representar risco para DEM, pois a ocorrência de ambas as doenças nos idosos torna a realização de estudos de coorte de difícil execução. Portanto, o cálculo amostral foi baseado na prevalência de DEM em pacientes com PB e controles.

Considerando-se a prevalência de doenças neuropsiquiátricas de 36% em pacientes com PB, descrita por Tarazona et al. (2015), e prevalência de demência de 10% em indivíduos acima de 65 anos, descrita por Chapman et al. (2006), definiu-se arbitrariamente como prováveis proporções de marcadores sorológicos positivos em pacientes com PB e em controles idosos, respectivamente. O inteiro ($n=1$) subtraído das referidas prevalências foi considerado para fins amostrais dos fatores protetores. Também foi considerada proporção de

casos e controles de 1:1, nível de confiança bicaudal de 95 e um poder de 80%. Pelo método Fleiss com correção contínua, estimou-se o número mínimo necessário de 48 casos e 48 controles. O cálculo amostral foi realizado no ambiente OpenEpi® version 3.01 (Emory University, Rollins School of Public Health, Atlanta, Georgia, USA) (Figura 5).

Sample Size for Unmatched Case-Control Study			
For:			
	Two-sided confidence level(1-alpha)	95	
	Power(% chance of detecting)	80	
	Ratio of Controls to Cases	1	
	Hypothetical proportion of controls with exposure	10	
	Hypothetical proportion of cases with exposure:	36	
	Least extreme Odds Ratio to be detected:	5.06	
	Kelsey	Fleiss	Fleiss with CC
Sample Size - Cases	42	40	48
Sample Size - Controls	42	40	48
Total sample size:	84	80	96
References			
Kelsey et al., Methods in Observational Epidemiology 2nd Edition, Table 12-15			
Fleiss, Statistical Methods for Rates and Proportions, formulas 3.18 & 3.19			
CC = continuity correction			
Results are rounded up to the nearest integer.			
Print from the browser menu or select, copy, and paste to other programs.			
Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--SSCC			
Print from the browser with ctrl-P			
or select text to copy and paste to other programs.			

Figura 5 – Cálculo realizado no ambiente OpenEpi®, para determinar o tamanho amostral da população de estudo deste projeto. O método Fleiss com correção contínua estimou como número mínimo necessário 48 casos e 48 controles.

4.3 - CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Pacientes com PB tiveram os achados clínicos confirmados por exames histopatológico e imunofluorescência direta (IFD) na biópsia da lesão, e por imunofluorescência indireta (IFI), confirmando depósito de IgG no teto da clivagem pela técnica de *Salt Split Skin* (SSS). Todos os pacientes eram acompanhados no ambulatório de dermatoses bolhosas autoimunes do HC-FMRP-USP, no período entre abril de 1993 e setembro de 2015.

Para compor o grupo de DEM, foram incluídos os pacientes em seguimento no ambulatório de demências, os quais preencheram os critérios estabelecidos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM5) (APA, 2014) e portanto, diagnosticados com DEM pelos profissionais da clínica de geriatria – coordenada pelo Prof. Dr. Julio Moriguti, assim como a avaliação do mini exame do estado mental (MEEM) e a escala de avaliação clínica da demência (CDR), ferramentas de diagnóstico descritas por Morris J.C. em 1993 (para consultar a tabela completa do escore clínico da demência vide Anexo 4). Os tipos de demência que constituem o grupo DEM são: demência devido a doença de Alzheimer e demência Mista (Alzheimer + AVC). Os pacientes foram pareados quanto à gravidade da doença, avaliada pela escala clínica da demência (CDR).

No grupo controle, foram incluídos indivíduos com idade superior a 50 anos sem evidência de doença neurológica, os quais foram recrutados no ambulatório de catarata da Oftalmologia, sob coordenação do Prof. André Messias. Para critério de inclusão foi avaliado o estado mental de cada um, empregando-se o MEEM (Anexo 5). A avaliação do MEEM foi baseada em critérios descrito por Duncan et al. (2004), em considerou-se normal os indivíduos que obtiveram pontuação acima de 27 pontos. Casos com pontuação menor ou

igual a 24 é considerado demência. A fim de abranger níveis de escolaridade mais adequados à realidade da população brasileira foram realizadas modificações e adaptações nos pontos de corte do MEEM, sendo que para indivíduos com menos de 4 anos de escolaridade, essa pontuação mínima passa para 17, em vez de 24 (KOCHHANN et al., 2009).

Ainda no grupo controle, foram excluídos da casuística os indivíduos portadores de outras doenças autoimunes, que faziam uso de medicamentos imunossupressores e corticoides, e indivíduos transplantados.

A casuística foi composta por: 50 pacientes com PB, 50 pacientes com DEM e 50 controles, constituindo um estudo comparativo entre os 3 grupos. As características demográficas estão mostradas na Tabela 3. Considerou-se a data da coleta da amostra de sangue para definição: da idade dos pacientes e controles; tempo de doença (grupo PB); e estar em tratamento ou não (grupo PB).

Observou-se predomínio do gênero feminino nos grupos PB e DEM (ambos com 62%). Ainda no grupo PB, em relação à idade, foi inferior quando comparada com aquela do grupo DEM (75 anos e 82,5 anos, respectivamente), porém, semelhante à dos controles (74 anos).

Em relação ao comprometimento neurológico, dividiu-se o grupo PB em 3 subgrupos: pacientes com PB que não apresentam doença neurológica (sem DN), pacientes com PB portadores de demência (com DEM) e pacientes com PB que possuíam outras doenças neurológicas (com DN). O tempo médio de evolução do PB foi maior para os grupos com DEM e outras DN (4 meses para ambos) em relação ao grupo sem DN (3 meses).

Outro aspecto investigado neste estudo foi se, no momento da coleta de sangue, os pacientes do grupo PB estavam ou não submetidos à terapia imunossupressora, não havendo diferença significativa entre a frequência de ambos.

Tabela 3- Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL).

		PB N=50 N (%)				DEM N=50 N (%)				CTL N=50 N (%)	Valor de p
		Associação com DN				Escala Clínica Demência					
		Sem DN N=37	Demência N=8	Outras DN N=5	Total	CDR1 N=17	CDR2 N=17	CDR3 N=16	Total		
Gênero	Masculino	15 (40,54)	2 (25,0)	2 (40,0)	19 (38)	7 (41,18)	9 (52,94)	13 (76,47)	19 (38)	22 (44)	0,779
	Feminino	22 (59,46)	6 (75,0)	3 (60,0)	31 (62)	10 (58,82)	8 (47,06)	3 (17,65)	31 (62)	28 (56)	
Idade (Anos)	Mediana	71	80	81	75*	81	83	82	82,5* ^δ	74 ^δ	< 0,001* ^δ
	Min/Max	43/90	70/84	70/92	43/92	71/87	71/92	60/89	60/92	51/93	
Tempo de Doença (Meses)	Mediana	3	4	4	4	NA	NA	NA	NA	NA	0,970
	Min/Max	1/120	1/8	1/8	1/120						
Em Tratamento	Sim	14 (37,84)	5 (62,5)	3 (60,0)	22 (44)	NA	NA	NA	NA	NA	0,247
	Não Φ	23 (62,16)	3 (37,5)	2 (40,0)	28 (56)						

Legenda: NA = Não aplicável ao grupo; Φ No momento da coleta os pacientes eram virgens de tratamento ou estavam sem tratamento há mais de 60 dias.

4.4 – COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os ambulatórios de arrolamento dos pacientes ou indivíduos controles e os grupos do estudo são descritos na Tabela 4. Após a coleta de 10 mL de sangue periférico em tubos com ativador de coágulo (BD Vacutainer, EUA), seguiu-se à centrifugação a 2000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos para separação do soro, o qual foi coletado e armazenado a - 80 °C até seu processamento nos ensaios de ELISA.

Tabela 4. Locais de coleta das amostras de sangue dos pacientes em colaboração com o Prof. Dr. Julio Moriguti, responsável pelo Ambulatório de Demências, e com o Prof. Dr. André Messias, responsável pelo Ambulatório de Catarata.

Período da Coleta	Local de Coleta	Grupo de estudo
23/04/93 – 26/11/15	▪ Ambulatório de Dermatoses Autoimunes da Divisão de Dermatologia do HC-FMRP/USP	Penfigoide Bolhoso (PB)
06/03/15 – 03/07/15	▪ Ambulatório de Demências da Divisão de Geriatria do HC-FMRP/USP	Demências (DEM)
02/03/15 – 06/07/15	▪ Ambulatório de Catarata do Departamento de Oftalmologia do HC-FMRP/USP	Controle

O planejamento desse estudo pode ser visto na Figura 6.

Figura 6 - Alocação dos grupos: pacientes com penfigoide bolhoso (PB), com demência (DEM) e controles. Destaque para as Subdivisões dos grupos PB e DEM.

4.5 - ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS BP180 E BP230

A detecção dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 foi realizada com os kits comerciais BP180 e BP230 (MBL[®], EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Brevemente, 100µl do soro do paciente, previamente diluídos a 1:101 no diluente fornecido pelo fabricante, foram adicionados ao poço de cada microplaca de ELISA previamente sensibilizada, respectivamente, com o antígeno recombinante BP180NC16a e com o antígeno recombinante BP230-N e BP230-C terminal, e incubada à temperatura ambiente (TA) por 60 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS

Tween 0,1 % em lavadora automatizada de microplaca de ELISA (Asys Atlantis, EUA) e adicionados em cada poço 100µl do conjugado (*Horseradish Peroxidase goat anti-human IgG*), sendo incubadas novamente à TA, por 60 minutos, e então lavadas por 4 vezes. Para revelação, adicionou-se 100µl do substrato (TMB/H₂O₂) e incubou-se à TA por 30 minutos. Finalmente, foram adicionados 100µl da solução stop (solução de ácido sulfúrico-H₂SO₄ a 1,0N) e realizada a leitura da absorbância/ densidade óptica (DO), em espectrofotômetro ASYS Expert Plus, filtro 450nm, com fundo de referência 620nm.

Os títulos dos anticorpos anti-BP180 e anti-BP230 são estimados em Unidades de valor / mL (UR/mL). O cálculo dos resultados expressos em UR/mL foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, seguindo a fórmula abaixo.

Unidade de Valor (UR/mL)

$$(UR/mL) = \frac{A_{450} <Amostra> - A_{450} <Calibrador Negativo>}{(A_{450} <Calibrador do Penfigoide Bolhoso> - A_{450} <Calibrador Negativo>)} \times 100$$

A₄₅₀: abreviação para valor de absorbância a 450nm

Os resultados obtidos em UR/mL na fórmula acima foram comparados com o ponto de corte sugerido pelo fabricante. Para ambos os anticorpos (anti-BP180 e anti-BP230), valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis.

4.6 - ELISA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BDNF ENDÓGENO

A detecção do BDNF endógeno foi realizada com o kit comercial *Human BDNF Immunoassay* (R&D System®, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 100µl do diluente fornecido pelo fabricante foram adicionados em cada poço das microplacas de ELISA previamente sensibilizadas com o anticorpo monoclonal para BDNF. Em seguida, 50µl do soro dos pacientes, previamente diluídos a 1:20 no diluente fornecido pelo fabricante, foram adicionados em cada poço, e as placas incubadas à temperatura ambiente (TA) por 2 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada poço 100µl do conjugado (anticorpo monoclonal específico para o BDNF humano conjugado a *horseradish peroxidase*), sendo as microplacas incubadas novamente à TA, por 1 hora, e então lavadas por 2 vezes com PBS Tween 0,05% em lavadora automatizada de microplaca de ELISA (Asys Atlantis, EUA). Para revelação, adicionou-se 200µl do substrato (TMB/H₂O₂) e incubou-se à TA por 30 minutos. Finalmente, foram adicionados 50µl da solução stop (solução de ácido sulfúrico-H₂SO₄ a 2N) e realizada a leitura da absorbância/ densidade óptica (DO), em espectrofotômetro ASYS Expert Plus, filtro 450nm, com fundo de referência 540nm.

Outro ponto de destaque é que estes testes apresentam alta especificidade na detecção do peptídeo BDNF, possibilitando inclusive a quantificação estimada dos títulos da proteína em amostras séricas, já que o fabricante fornece 7 pontos de calibração com quantificação conhecida (0, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 pg/mL), possibilitando a construção de uma curva padrão estimando-se a quantificação da proteína sérica. A partir da leitura da absorbância dos 7 calibradores, foi construído um gráfico utilizando as 7 leituras de absorbância dos calibradores e sua quantificação estimada em pg/mL. As quantificações estimadas para os calibradores em pg/ mL foram utilizadas para elaborar uma curva padrão.

Os resultados obtidos em pg/mL pela fórmula acima, em que y corresponde ao valor da leitura da absorbância / densidade óptica de cada amostra de soro e x corresponde à quantificação estimada de proteína em pg/mL, possibilitou calcular a concentração (pg/mL) sorológica do BDNF de cada amostra testada.

4.7 – IFI-SSS PARA DETECÇÃO DE IGG E C3 EM AMOSTRAS SOROLÓGICAS

Amostras de pele normal obtidas em cirurgia plástica são incluídas em meio de criopreservação O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura, Finetechnical Co, Tokio, Japan), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o processamento.

Cortes de 5 µm são obtidos em criostato (Microm HM525, UK) e transferidos para lâminas de vidro silanizadas. Após fixação em acetona a 4 °C por 10 min, lavam-se os cortes em PBS pH 7.4. A seguir, os cortes são incubados com amostras de soro dos pacientes na concentração inicial de 1:10. Após lavagens em PBS, os cortes são incubados com anticorpo anti-IgG e anti-C3 humano marcados com fluoresceína (FITC) segundo indicações

do fornecedor. Após lavagens com PBS, os cortes são contracolorados com Azul de Evans (Sigma-Aldrich®, MO, USA) e montadas com Vectashield (Vector Laboratories®, CA, USA) e lamínula para posterior leitura em microscópio de epiluminescência (Imager-A1®, Zeiss, Alemanha). As lâminas foram avaliadas e fotografadas logo após o término do experimento no microscópio de fluorescência Zeiss (West Germany) no Laboratório do Setor de Dermatologia do HC-FMRP-USP.

4.8 - ESTUDO ESTATÍSTICO

Para a análise estatística, utilizou-se o software Graphpad Prism 7.0, adotando-se nível de significância de 5% com valor de $p \leq 0,05$, e o mesmo foi utilizado para geração de gráficos. Para a análise dos resultados das variáveis qualitativas, utilizou-se o teste do X^2 . Como os dados não apresentaram distribuição normal (não paramétrica), foram aplicados os testes de Mann-Whitney para comparar duas amostras, e de Kruskal-Wallis para três amostras (quando significativo, prosseguiu-se à comparação múltipla de Dunn). A correlação entre duas variáveis foi analisada pelo teste de Spearman.

4.9 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Devido ao pequeno tamanho amostral dos subgrupos do PB, que propicia distribuição de frequências menores de algumas variáveis, algumas interações que geraram diferenças não significantes podem ter sido influenciadas.

5. RESULTADOS

5.1 – FREQUÊNCIA DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS (DN) EM PACIENTES COM PB ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE DERMATOSES AUTOIMUNES, HC-FMRP-USP

Em 50 pacientes com PB, 13 pacientes (26%) foram diagnosticados com DN e 37 (74%) sem DN. Entre os 13 pacientes com DN, 8 (16%) tiveram o diagnóstico de DEM; 3 (6%) de AVC e 2 (4%) foram diagnosticados com epilepsia (Figura 7). Foram observados dois tipos predominantes de demência: 5/8 (63%) pacientes apresentaram demência vascular e 3/8 (38%), demência devido à doença de Alzheimer.

Ao se comparar os subgrupos DEM, outras DN e sem DN, houve diferença estatística em relação ao gênero ($p = 0,7105$). A associação com doenças neurológicas (DEM, AVC e epilepsia) foi mais frequente no sexo feminino [9/13 (69%)], comparada ao sexo masculino [4/13 (31%)].

Nos subgrupos DEM, outras DN e sem DN as medianas da idade foram 80, 81 e 71 anos, respectivamente. Comparando os 3 subgrupos entre si, houve diferença estatística em relação à idade ($p = 0,0435$). Porém, ao se comparar os subgrupos 2 a 2 não observamos diferença estatística ($p > 0,05$).

Dos 50 pacientes com PB, 8 foram a óbito (16%) sendo 1 deles portador de doença neurológica (epilepsia).

Figura 7 – Frequência de doenças neurológicas (DN) nos pacientes com penfigoide bolhoso, diagnosticados no ambulatório de dermatoses bolhosas autoimunes da Divisão de Dermatologia, HC-FMRP/USP.

Legenda: AVC: acidente vascular cerebral; DEM: demência; EPP: epilepsia

5.2 – DETECÇÃO QUALITATIVA DOS ANTICORPOS IgG CONTRA PROTEÍNAS HEMIDESMOSSOMAS BP180 E BP230

A Tabela 5 mostra a distribuição do resultado do teste ELISA (positivo ou negativo) para os autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 nos grupos de estudo. Os pacientes com PB apresentaram maior porcentagem de anticorpos anti-BP180 (74%), quando comparado com anticorpos anti-BP230 (40%). No grupo DEM, 10% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, ambos em igual porcentagem (10%). Chama a atenção que 14% dos controles apresentaram anticorpos anti-BP180.

Tabela 5 - Distribuição dos resultados qualitativos do teste ELISA para anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle.

		PB	DEM	Controle	Valor de p
		N (%)	N (%)	N (%)	
IgG Anti-BP180	Positivo	37 (74)	5 (10)	7 (14)	< 0,00001
	Negativo	13 (26)	45 (90)	43 (86)	
IgG Anti-BP230	Positivo	20 (40)	5 (10)	1 (2)	< 0,00001
	Negativo	30 (60)	45 (90)	49 (98)	

Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. Os títulos foram semelhantes nos grupos DEM e controle (anti-BP180: $p=0,7596$; anti-BP230: $p=0,2044$).

5.3 - QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IgG ANTI-BP180 E ANTI-BP230

Em relação à titulação dos autoanticorpos contra as proteínas hemidesmosomais (UR/mL), as medianas para anti-BP180 nos grupos PB, DEM e controles resultaram: 54,84; 1,75 e 1,75, respectivamente, com diferença significativa quando se comparam os 3 grupos entre si ($p<0,0001$). Comparando os grupos 2 a 2, observamos diferença estatística entre PB e DEM ($p<0,0001$) e aos controles ($p<0,0001$), entretanto, não se observou diferença quando comparados DEM e controles ($p>0,9999$) (Figura 8). Em relação à quantificação de anticorpos anti-BP230 (UR/mL), as medianas foram: 6,25 no grupo PB; 2,30 no grupo DEM e 2,35 no grupo controle, com diferença significativa quando se comparam os 3 grupos entre si ($p<0,0001$). O grupo PB apresentou maiores títulos, comparado aos demais grupos ($p<0,0001$), porém, não se observou diferença quando comparados DEM e controles ($p>0,9999$).

Figura 8 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ensaio ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL). Títulos de anti-BP180 no grupo PB resultaram mais elevados em relação aos dos grupos DEM e controle; títulos anti-BP230 no grupo PB resultaram mais elevados, em relação aos dos grupos DEM e controle. Os títulos foram semelhantes nos grupos DEM e controle. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana. Linha tracejada: *cutoff* para limiar de normalidade.

5.3.1 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 nos subgrupos PB

Em relação aos títulos IgG anti-BP180 (UR/mL), as medianas nos subgrupos DEM, outras DN e sem DN resultaram: 82,0; 186,0 e 49,0, respectivamente (Figura 9). Ao se comparar os 3 subgrupos, não houve diferença significativa ($p=0,1281$). Para os títulos IgG anti-BP230 (UR/mL), as medianas nos subgrupos DEM, outras DN e sem DN resultaram: 18,5; 4,0 e 5,0, respectivamente (Figura 9). Também não houve diferença significativa na comparação dos 3 subgrupos ($p=0,0808$).

Figura 9 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ensaio ELISA nos subgrupos do PB. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana. Linha tracejada: *cutoff* para limiar de normalidade.

Legenda: DEM: grupo demência; DN: doenças neurológicas.

5.3.2 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 nos subgrupos DEM

Em relação aos títulos de IgG anti-BP180 (UR/mL), as medianas nos subgrupos CDR1, CDR2 e CDR3 resultaram: 1,0; 2,0 e 1,0 respectivamente (Figura 10). Quando se compara os 3 subgrupos, não houve diferença significativa ($p=0,6122$). Para os títulos IgG anti-BP230 (UR/mL), as medianas nos subgrupos CDR1, CDR2 e CDR3 resultaram: 1,0; 3,0 e 2,0 respectivamente (Figura 10), sem diferença significativa comparando os 3 subgrupos ($p=0,2702$).

Figura 10 - Quantificação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ensaio ELISA nos subgrupos de demência. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana. Linha tracejada: *cutoff* para limiar de normalidade.

Legenda: CDR: Escala clínica da demência.

5.4 - DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E C3 CONTRA PEPTÍDEOS HEMIDESMOSSOMAS POR IFI (SSS) NOS GRUPOS DEM E CONTROLE

Dos 50 pacientes do grupo DEM incluídos nesta análise, em 5 (10%) observou-se positividade para o anticorpo IgG anti-BP180 e, em outros 5 (10%) pacientes, observou-se positividade para o anticorpo IgG anti-BP230, portanto, amostras de soro dos 10 (20%) pacientes foram utilizadas na IFI (Tabela 6; Figura 11). A detecção de IgG no teto da clivagem foi obtida em 2/10 (20%) deles. Mais detalhadamente, em 1 dos pacientes observou-se depósito de IgG (+++) no teto da clivagem, e focos de IgG (+) e de C3 (+) no assoalho da clivagem. No outro paciente, observou-se depósito fraco de IgG no teto da clivagem e C3 negativo.

Dos 50 pacientes do grupo CTL, em 7 (14%) pacientes observou-se positividade para o anticorpo IgG anti-BP180 e, 1 desses 7 pacientes também apresentou positividade para o anticorpo IgG anti-BP230; todas as IFI apresentaram resultado negativo (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos resultados da detecção de anticorpos séricos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) e da IFI em amostras de soro de pacientes dos grupos demência (DEM) e controle (CTL).

	Grupo	ELISA anti-BP180		ELISA anti-BP230		IFI (SSS)	
		Título	Resultado	Título	Resultado	IgG	C3
1	DEM	1,2	N	16,3	P	N	N
10	DEM	4,8	N	10,6	P	+++ no teto da clivagem; + no assoalho da clivagem	+ no assoalho da clivagem
12	DEM	0,8	N	10,1	P	N	N
16	DEM	13,0	P	1,7	N	N	N
19	DEM	12,2	P	4,4	N	Fraco no teto da clivagem	N
25	DEM	15,6	P	2,6	N	N	N
26	DEM	3,3	N	15,7	P	N	N
40	DEM	10,5	P	2,0	N	N	N
46	DEM	38,7	P	2,7	N	N	N
50	DEM	1,3	N	33,2	P	N	N
19	CTL	10,4	P	4,2	N	N	N
23	CTL	17,4	P	4,6	N	N	N
25	CTL	10,3	P	1,0	N	N	N
27	CTL	18,9	P	5,0	N	N	N
36	CTL	45,8	P	5,3	N	N	N
41	CTL	16,9	P	11,2	P	N	N
50	CTL	15,0	P	7,0	N	N	N

P: Positivo / N: Negativo

Figura 11 – IFI com pele de prepúcio humano como substrato, soro 1:10, e anti-IgG marcado com FITC. **A:** Observar fluorescência linear na ZMB. **B:** pela técnica *Salt Split Skin*, observar fluorescência no teto da clivagem, e discretos focos no assoalho da clivagem; fluorescência compatível com penfigoide bolhoso (soro de paciente de no. 10) (tabela 6) (aumento de 40 xx).

5.5 - QUANTIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO BDNF

Em relação à concentração sérica do peptídeo BDNF (pg/mL), as medianas nos grupos PB, DEM e controles resultaram: 16,88; 25,41 e 38,21, respectivamente, com diferença significativa quando se comparam os grupos PB, DEM e controles ($p < 0,0001$) (Figura 12). Comparando-se os grupos 2 a 2, também houve diferença entre PB e DEM ($p < 0,0001$), PB e controles ($p < 0,0001$), e DEM e controles ($p < 0,0001$).

Figura 12 - Quantificação sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL). Pacientes com PB apresentaram concentrações menores do peptídeo BDNF, comparados aos demais grupos. Pacientes do grupo DEM apresentaram concentrações menores de BDNF comparados ao grupo controle. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

5.5.1 - Quantificação do peptídeo BDNF nos subgrupos PB

Em relação à concentração sérica do peptídeo BDNF (pg/mL), as medianas nos subgrupos DEM, outras DN e sem DN resultaram: 9,10; 16,52 e 17,15, respectivamente (Figura 13). Quando se comparam os 3 subgrupos, houve diferença significativa ($p=0,0485$). Ao comparar os subgrupos 2 a 2, não houve diferença estatística entre os grupos DEM e sem DN ($p=0,0589$); DEM e outras DN ($p>0,9999$), e sem DN e outras DN ($p=0,8045$).

Os pacientes com PB que apresentaram associação com DEM também foram alocados de acordo com o tipo de demência: 5/8 (63%) pacientes com demência vascular e 3/8 (38%) pacientes com demência devido à doença de Alzheimer. As medianas da concentração sérica de BDNF nos pacientes com demência vascular e demência devido à DA foram 8,71 e 9,49 pg/mL, respectivamente, e não houve diferença estatística ($p=0,9014$).

Figura 13 - Quantificação sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos subgrupos de PB. As barras representam valores mínimos e máximos. Pacientes com PB com associação com DEM apresentam os menores níveis de BDNF ($p=0,0485$). O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

Legenda: DEM: grupo demência; DN: doenças neurológicas.

5.5.2 - Quantificação do peptídeo BDNF nos subgrupos de DEM

Em relação à concentração sérica do peptídeo BDNF (pg/mL), as medianas nos subgrupos CDR1, CDR2 e CDR3 resultaram: 30,17; 25,13 e 23,37, respectivamente (Figura 14), com diferença significativa quando se comparam os 3 subgrupos entre si ($p=0,0004$). Comparando os subgrupos 2 a 2, observamos diferença estatística entre CDR1 e CDR3 ($p=0,0002$), entretanto, não se observou diferença quando comparados CDR2 ao CDR3 ($p=0,3061$) e CDR1 ao CDR2 ($p=0,0551$).

Os pacientes do grupo DEM foram também alocados de acordo com o tipo de demência: 22/50 (44%) pacientes com demência mista e 28/50 (56%) pacientes com demência devido à doença de Alzheimer. As medianas dos níveis sorológicos de BDNF (pg/mL) nos pacientes com demência mista e demência devido à DA foram 22,43 e 26,40, respectivamente ($p = 0,1041$).

Figura 14 – Quantificação sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos subgrupos DEM. O subgrupo CDR3 apresentou níveis mais baixos de BDNF comparados aos do CDR1 ($p=0,0004$). As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

5.6 - CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

Sendo a casuística do grupo PB e DEM constituída por maior contingente do gênero feminino em relação ao grupo controle, e visto que o grupo DEM apresenta pacientes com idade mais elevada que os demais grupos, e visando eliminar os possíveis confundidores responsáveis por concentrações séricas diminuídas do peptídeo BDNF no grupo PB, as concentrações desse peptídeo foram comparadas e correlacionadas com essas variáveis. Os títulos de anti-BP180 e anti-BP230 também foram correlacionados com essas variáveis.

5.6.1 – Relação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com o gênero nos grupos de estudo

Houve diferença significativa dos títulos de anti-BP180 no gênero feminino, e no gênero masculino, ao se comparar os grupos PB, DEM e controle ($p < 0,0001$). Ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa ($p = 0,6737$; $p = 0,2710$; $p = 0,0053$, respectivamente) (Figura 15). Para os títulos de anti-BP230 também se observou diferença significativa no gênero feminino e masculino ao se comparar os grupos PB, DEM e controle ($p < 0,0001$). Ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa ($p = 0,3843$; $p = 0,2493$; $p = 0,0525$, respectivamente) (Figura 15).

Figura 15 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo PB em relação ao gênero. Houve diferença significativa entre os gêneros feminino e masculino ($p < 0,0001$) nos 3 grupos estudados. Porém, ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

5.6.2 – Correlação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com a idade nos grupos de estudo

Para o grupo PB, os títulos de anticorpos IgG anti-BP180 são tanto maiores conforme aumenta-se a idade (correlação de Spearman, $r=0,3529$ e $p=0,0119$). Já os títulos de anticorpos IgG anti-BP230 não apresentou relação significativa com a idade (correlação de Spearman, $r=0,1735$ e $p=0,2282$) (Figura 16).

Figura 16 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo PB em relação à idade. Para IgG anti-BP180: pacientes com PB apresentam títulos mais elevados de anticorpos segundo a idade ($p=0,0119$). Para IgG anti-BP230, $p=0,2282$.

No grupo DEM, não houve correlação entre a idade e os títulos sorológicos de BP180 (correlação de Spearman, $r=-0,1724$ e $p=0,2313$) e BP230 (correlação de Spearman, $r=0,1746$ e $p=0,2253$) (Figura 17).

Figura 17 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo DEM em relação à idade ($p>0,05$).

Para o grupo controle, também não houve correlação entre a idade e títulos de anti-BP180 (correlação de Spearman, $r=-0,2008$ e $p=0,1621$) e anti-BP230 (correlação de Spearman, $r=-0,1148$ e $p=0,4271$) (Figura 18).

Figura 18 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo CTL em relação à idade ($p>0,05$).

5.6.3 – Correlação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com o tempo de doença no grupo PB

O grupo PB apresenta títulos mais elevados de anticorpos IgG anti-BP180 quanto menor o tempo de doença (correlação de Spearman, $r=-0,3282$ e $p=0,02$) (Figura 19). Já para o anticorpo IgG anti-BP230 não se observou correlação com o tempo de doença (correlação de Spearman, $r=-0,0739$ e $p=0,6103$).

Figura 19 – Títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo PB, segundo o tempo de doença em meses. O grupo PB apresenta títulos mais elevados de anticorpos IgG anti-BP180 quanto menor o tempo de doença ($p=0,02$). Para IgG anti-BP230, $p=0,6103$.

5.6.4 – Relação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com o tratamento no grupo PB

Avaliou-se estar ou não em tratamento imunossupressor no momento da coleta do soro em relação à titulação dos anticorpos. Houve relação entre títulos de anticorpos IgG anti-

BP180 e estar ou não em tratamento ($p=0,0417$) pela análise univariada. Já para os títulos de anti-BP230 não houve diferença significativa ($p=0,3184$) (Figura 20). O tratamento implica na diminuição dos níveis de anticorpos circulantes anti-BP180, porém, não influencia os níveis de anti-BP230.

Figura 20 – Titulação dos anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo penfigoide bolhoso (PB), segundo estar ou não em tratamento no momento da coleta do soro. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

5.6.5 – Relação da concentração sérica de BDNF com o gênero nos grupos de estudo

Houve diferença significativa das concentrações séricas de BDNF no gênero feminino, e no gênero masculino, ao se comparar os três grupos - PB, DEM e controle ($p<0,0001$). Ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa ($p=0,9331$; $p=0,7552$; $p=0,6880$, respectivamente) (Figura 21).

Figura 21 – Concentração sérica do peptídeo BDNF (pg/mL) por ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL) segundo o gênero. Houve diferença significativa entre os gêneros feminino e masculino nos 3 grupos estudados ($p < 0,0001$). Porém, ao se comparar os gêneros masculino e feminino em cada grupo, não houve diferença significativa. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

5.6.6 – Correlação da concentração sérica de BDNF com a idade nos grupos de estudo

Para o grupo PB, os níveis séricos de BDNF não apresentaram correlação com a idade (correlação de Spearman, $r = -0,2035$ e $p = 0,1563$), assim como para os grupos DEM e controle ($r = -0,2672$ e $p = 0,0611$; $r = 0,2232$ e $p = 0,1193$, respectivamente), podendo-se inferir que a idade não é um fator confundidor (Figura 22).

Figura 22 – Níveis séricos de BDNF (pg/mL) por ELISA nos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência (DEM) e controle (CTL) em relação à idade ($p>0,05$).

5.6.7 – Correlação da concentração sérica de BDNF com o tempo de doença no grupo PB

Além de não ser identificada diferença significativa (correlação de *Spearman*, $r=0,0244$ e $p=0,8663$) na avaliação univariada no grupo PB, também não foi observada relação significativa entre os níveis do peptídeo BDNF com a variável tempo de doença nos subgrupos com DEM ($p=0,9222$), com outras DN ($p=0,2540$) e sem DN ($p=0,61$) (Figura 23).

Figura 23 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com o tempo de doença em meses no grupo PB ($r=0,0244$; $p=0,8663$).

5.6.8 – Relação da concentração sérica de BDNF com o tratamento no grupo PB

Estar ou não em tratamento imunossupressor no momento da coleta do soro foi avaliado em relação à concentração sérica do peptídeo BDNF, não havendo diferença significativa na análise univariada ($p=0,8960$). (Figura 24).

Figura 24 – Concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA no grupo PB segundo estar ou não em tratamento no momento da coleta do soro. As barras representam valores mínimos e máximos. O box representa os valores dos quartis entre 25% e 75%. A linha horizontal representa a mediana.

5.6.9 – Correlação dos títulos sorológicos IgG anti-BP180 e anti-BP230 com a concentração sérica de BDNF nos grupos de estudo

Os títulos de anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 foram correlacionados aos níveis séricos de BDNF no grupo PB (Figura 25) pelo teste de *Spearman*, não sendo significante ($r = -0,0547$, $p = 0,7057$; $r = -0,1529$, $p = 0,2891$, respectivamente).

Figura 25 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com título dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo penfigoide bolhoso (PB). Para anti-BP180: $p=0,7057$; para anti-BP230: $p=0,2891$.

Para o grupo DEM, os títulos de anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 também foram correlacionados aos níveis séricos de BDNF (correlação de *Spearman*, $r=0,1855$ e $p=0,1972$; $r=-0,0524$ e $p=0,7178$, respectivamente), não havendo diferença significativa (Figura 26).

Figura 26 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo demência (DEM). Para anti-BP180: $p=0,1972$; para anti-BP230: $p=0,7178$.

Os títulos de anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 foram correlacionados aos níveis séricos de BDNF no grupo controles (Figura 27) pelo teste de correlação de *Spearman*, não havendo correlação significativa ($r=-0,0958$ e $p=0,5079$; $r=-0,0666$ e $p=0,6456$, respectivamente).

Figura 27 – Correlação das concentrações séricas de BDNF (pg/mL) por ELISA com títulos dos anticorpos IgG anti-BP180 e IgG anti-BP230 (UR/mL) por ELISA no grupo controle (CTL). Para anti-BP180: $p=0,5079$; para anti-BP230: $p=0,6456$.

6. DISCUSSÃO

Faremos a discussão em tópicos, relatando os resultados significantes concernentes aos marcadores sorológicos estudados, comparando-os aos da literatura consultada, com formulação de hipóteses sobre provável relação do PB com DEM.

Frequência de doenças neurológicas em pacientes com PB

A prevalência de DN em amostragem de pacientes que apresentam PB vem sendo relatada por diversos grupos. Na presente casuística de 50 pacientes com PB, 13 (26%) apresentavam DN, sendo a DEM (16%) a DN mais prevalente, corroborando com os achados na literatura. Observamos dois tipos predominantes de DEM nos pacientes com PB: 5 pacientes (63%) apresentaram demência vascular e 3 pacientes (38%) demência devida à doença de Alzheimer. O AVC (6%) e epilepsia (4%) também estiveram associadas ao PB.

Cordel et al., em 2007, conduziram na França estudo retrospectivo com 341 pacientes com PB, e relataram a prevalência de 36% de DN. Similar aos nossos achados, relataram a DEM (20%) como mais frequente, seguida do AVC (15%), Doença de Parkinson (9%) e outras DN não relatadas (< 5%). Da mesma forma, Chen et al. (2011), em estudo retrospectivo na China, encontraram a prevalência de DN em 1.752 (50,3%) de 3.485 pacientes com PB, sendo a DEM (O.R. 4,81; 95% IC; $p<0,03$) a mais prevalente, seguida da epilepsia (O.R. 3,97; 95% IC; $p<0,03$), Doença de Parkinson (O.R. 3,49; 95% IC; $p<0,03$) e AVC (O.R. 3,30; 95% IC; $p<0,03$). Phoon et al., em 2015, em estudo retrospectivo em Singapura com 97 pacientes com PB, relataram a prevalência de DN em 60 (61,9%) pacientes e também associaram maior frequência de DEM (O.R. 4,9; 95% IC; $p=0,01$) nesses pacientes, seguida do AVC (O.R. 2,0; 95% IC; $p=0,10$).

Mais recentemente, CHEVALIER et al. (2016), em estudo retrospectivo (1997 a 2011) na França com 178 pacientes com PB, relataram a prevalência de DN em 84 (47,2%) pacientes, e 43 (24,2%) deles apresentavam DEM. Os pacientes que apresentavam associação com DEM eram idosos, com média de idade de 84 anos. Concluíram que a coexistência de DN ou de DEM nos pacientes com PB estava associada com o alto índice de mortalidade ($p=0,03$ e $p<0,001$, respectivamente).

Tarazona et al., em 2015, em estudo com 25 pacientes com PB no Brasil, relataram associação com DN em 36%, na faixa de 80-89 anos. Em contrapartida com o nosso estudo, o AVC (44,4%) foi mais prevalente, seguido da DEM (22,2%) e epilepsia (11,1%). De forma semelhante, Kwan et al., em 2015, em estudo retrospectivo com 43 pacientes com PB, na Malásia, relataram elevada frequência de associação com DN (44,2%), sendo a prevalência de AVC mais frequente (30,2%), seguida da DEM (20,9%), epilepsia (4,7%) e doença de Parkinson (2,3%). Pietkiewicz et al. (2015) também relataram maior prevalência de AVC (12,77%) em estudo retrospectivo conduzido na Europa, com 94 pacientes com PB, sendo a DEM descrita em 5,32% dos pacientes.

Observamos também no nosso estudo que as medianas da idade dos pacientes que apresentaram associação do PB com DEM e outras DN foram 80 e 81 anos, respectivamente. A prevalência de DN foi mais frequente no sexo feminino (69%) do que no masculino (31%). Esses dados corroboram com o trabalho de Tarazona et al. (2015), já citado anteriormente, em que relataram prevalência de DN nos pacientes com PB na faixa etária 80-89 anos e no sexo feminino (77%).

A presença de autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 em pacientes com PB pode representar possível fator predisponente para o desencadeamento de DN, uma vez que ambos os tecidos epitelial e neuronal derivam do mesmo folheto embrionário, o ectoderma.

Vários estudos vêm demonstrando o mimetismo molecular existente entre a pele e o SNC. Experimentos mostram que (i) soros de pacientes com PB reconhecem a proteína BP230 no tecido neuronal (CHEN et al., 2011; CLAUDEPIERRE et al., 2005), e (ii) a proteína BP180, também conhecida por colágeno XVII, é amplamente expressa no tecido neuronal (FURUE; KADONO, 2015; MESSINGHAM et al., 2015) .

Resultados sorológicos anti-BP180 e anti-BP230 no grupo PB

Em nosso estudo, a frequência de detecção de anticorpos IgG anti-BP180 (74%) e de anti-BP230 (40%) foi maior no grupo PB, comparada às dos grupos DEM e controle, conforme já esperado. Alocando-se os pacientes do grupo PB de acordo com a presença ou não de associação com DN (DEM, outras DN e sem DN) não houve diferença significativa dos títulos dos anticorpos anti-BP180 e anti-BP230 nos três subgrupos.

Quando comparados os títulos de anticorpos IgG anti-BP180 e anti-BP230 no grupo PB, os pacientes apresentaram títulos mais elevados de anti-BP180 (mediana = 54,84 UR/mL) em relação ao anti-BP230 (mediana = 6,25 UR/mL). Este resultado corrobora com os achados na literatura, evidenciando maior positividade do ELISA anti-BP180 (74%) em pacientes com PB quando comparada com a positividade do marcador BP230 (40%).

O papel do antígeno BP180 na patogênese do PB tem sido considerado e avaliado por diversos grupos de estudo. O epítipo imunodominante associado ao PB foi mapeado como sendo a região NC16A do antígeno BP180, componente extracelular do hemidesmosomo (GIUDICE et al., 1993; WADA et al., 2016; ZILLIKENS et al., 1997). Como o antígeno BP230 fica restrito à região citosólica do hemidesmosomo, provavelmente, a sua localização limita o acesso de anticorpos ao antígeno. Assim, pacientes com diagnóstico

de PB apresenta concentrações séricas do anticorpo anti-BP180 mais elevadas quando comparadas ao anti-BP230, uma vez que o BP180 se encontra no domínio extracelular do hemidesmossomo (KASPERKIEWICZ; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2012; SCHMIDT; ZILLIKENS, 2010).

Charneux et al., em 2011, em um trabalho conduzido na França, com 138 pacientes com PB, relataram que 86% deles eram soropositivos para anti-BP180, enquanto que 59% para anti-BP230.

Esmaili et al. (2014) estimaram a soroprevalência de BP180 em 88% de 50 pacientes recentemente diagnosticados com PB no Irã. Lévy-Sitbon et al. (2014) avaliaram 30 pacientes com PB na França, e identificaram soroprevalência de anticorpos contra BP180 em 80% da população de estudo, contrastando com 60% de anticorpos contra BP230.

Ishiura et al., 2008, conduziram estudo caso-controle, no Japão, em pacientes com diagnóstico de PB a fim de associar a relação de ambos os autoanticorpos contra os antígenos BP180 e BP230 com a clínica desses pacientes. Dos 67 pacientes com PB, 63 (94%) apresentaram positividade para o anticorpo IgG anti-BP180, contrastando com 48 (72%) pacientes com positividade para o anticorpo IgG anti-BP230. A soroprevalência de anticorpos IgG anti-BP180 se correlaciona com o grau da doença que o paciente se encontra, sendo os títulos mais elevados nos estágios iniciais da doença (CAI et al., 2015; ISHIURA et al., 2008; MESSINGHAM et al., 2009; SCHMIDT, ZILLIKENS, 2013).

A variável - tempo de doença - foi correlacionada com os títulos de anti-BP180, havendo relação inversa significativa. Assim, nos estágios iniciais da doença, as concentrações séricas de anti-BP180 são mais elevadas, corroborando com achados da literatura. Ainda, estar ou não em tratamento foi também correlacionado com os níveis de anti-BP180 e anti-BP230, e observou-se diferença estatística para os níveis de anti-BP180. Portanto, pacientes

sem tratamento apresentam títulos sorológicos mais elevados de anti-BP180 do que pacientes em tratamento, o que já era de se esperar devido ao tratamento com imunossupressor. Sugere-se que a quantificação de anticorpos anti-BP180 possa ser utilizada como indicador de estado da doença no momento do diagnóstico e no seguimento do paciente.

Dados da relação do tempo de doença com os títulos de anti-BP180, frequentemente baseados em estudo caso-controle, apontam para a associação do antígeno BP180 com a gravidade da doença. Hofmann et al., em 2002 na Suíça, publicaram a alta especificidade reacional de soros dos pacientes com PB (80%) de se ligarem ao antígeno BP180. Esse achado também foi descrito em outro estudo caso-controle, também conduzido na Suíça, em que 54% dos soros do grupo PB reconheceram pelo menos um domínio antigênico do BP180, e ainda correlacionam esse marcador antigênico com o grau de gravidade da doença (DI ZENZO et al., 2004). Em recente estudo prospectivo, conduzido em pacientes asiáticos com PB por 12 semanas, o marcador BP180 mostrou-se potente indicador de gravidade da doença ($r=0,085$; $p<0,001$) (CAI et al., 2015).

Dentre as demais variáveis analisadas no grupo de estudo PB, não houve relação significativa entre os títulos anti-BP180 e anti-BP230 com o gênero.

Ao se avaliar títulos de anticorpos IgG anti-BP180 em relação à idade, houve correlação positiva. Já os títulos de anti-BP230 não se correlacionaram com a idade.

Resultados sorológicos anti-BP180 e anti-BP230 nos grupos DEM e controle

Outro achado a ser ressaltado neste estudo foi a detecção de positividade do anti-BP180 no soro dos indivíduos do grupo controle. Em 7/50 (14%) controles, observou-se níveis elevados de anti-BP180; enquanto que apenas 1 (2%) deles apresentou positividade

para anti-BP230, não havendo correlação significativa entre os títulos de anti-BP com a idade e o gênero.

Recentemente, um estudo retrospectivo com 374 pacientes idosos sem manifestação de PB, com idade média de 71,1 anos, atendidos em um serviço de dermatologia na Holanda, mostrou que 51/374 (13,6%) dos pacientes apresentaram positividade para pelo menos um teste sorológico, ELISA anti-BP180 e/ou ELISA anti-BP230 (MEIJER et al., 2015).

Hachisuka et al., em 1996, utilizaram amostras de pacientes idosos sem problemas dermatológicos para dosagem de títulos de anticorpos anti-ZMB (BP180 e BP230), obtendo resultado positivo para ambos os anticorpos em 6/32 (19%). De forma semelhante, Van Beek et al. (2014) detectaram 31,2% de positividade para anticorpos anti-ZMB (BP180 e BP230) em soro de pacientes idosos sem manifestação de PB.

Em nosso estudo, pacientes do grupo DEM apresentaram 10% de positividade para anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, não havendo correlação dos títulos anti-PB com idade ou gênero. Considerando os subgrupos segundo a gravidade da doença em CDR1, CDR2 e CDR3, e analisando os títulos de anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, não houve significância estatística. A literatura é desprovida de relatos sobre a análise de títulos anti-BP na DEM.

A investigação por IFI dos pacientes dos grupos de estudo DEM e controles, que apresentaram positividade para BP180 e/ou BP230, mostrou que 2/10 pacientes do grupo DEM apresentaram marcação de fluorescência para IgG e C3 compatível com o diagnóstico de PB, sem, contudo apresentarem a expressão clínica da doença PB. De forma semelhante, Prüßmann et al., em 2015, mostraram que em 7063 soros de indivíduos sem doença bolhosa autoimune, 62 (0,88%) apresentam positividade na IFI.

Resultados sorológicos da neurotrofina BDNF

No presente estudo, quando comparadas as concentrações de BDNF entre os grupos, os pacientes com PB (mediana = 16,88 g/mL) apresentaram menores concentrações que os pacientes do grupo DEM (mediana = 25,41 pg/mL) e controles (mediana = 38,21 pg/mL). Assim, pode-se sugerir que a redução nos níveis séricos do BDNF pode refletir na diminuição da sua expressão no tecido cerebral. Portanto, a quantificação sérica desse peptídeo poderia ser utilizada como marcador neurobiológico na manifestação da DEM. A literatura é desprovida de estudos que buscam quantificar os níveis séricos de BDNF em amostras sorológicas de pacientes com PB, sendo este estudo pioneiro a estabelecer esta relação.

O envolvimento da neurotrofina BDNF com DN tem sido abordado por diversos grupos de pesquisadores, dentre elas a demência vascular, demência frontotemporal, doença de Parkinson e a demência devido a doença de Alzheimer (BUCHMAN et al., 2016; KIM et al., 2016; LEVADA, CHEREDNICHENKO, 2015; MICHALSKI et al., 2015).

Quantificação do peptídeo BDNF foi incluída no importante coorte Framingham. Nesse coorte com 2131 indivíduos livres de demência, Weinstein et al. (2014) relacionaram os níveis séricos de BDNF com o risco de desenvolver demência. Cento e quarenta (6,6%) indivíduos desenvolveram demência, sendo o BDNF considerado como fator de risco, visto que em 33% desses indivíduos a concentração de BDNF estava diminuída.

No nosso estudo, os pacientes do grupo PB foram alocados segundo a associação ou não com DN: PB sem DN, PB com DEM e PB com outras DN (exceto DEM). Houve diferença significativa nos níveis séricos do peptídeo BDNF comparando os 3 subgrupos. Entretanto, quando comparamos os pacientes com PB associado à DEM com aqueles sem

DN, não houve diferença estatística, porém com tendência à significância. Ao estratificar os pacientes com PB em associação com DEM segundo o tipo de demência: demência vascular em 5/8 (63%) pacientes e demência devido à DA em 3/8 pacientes (38%), não houve diferença estatística, provavelmente influenciado pelo pequeno tamanho amostral.

Portanto, os baixos valores de BDNF do grupo PB que apresentaram associação com DEM (mediana=9,1 pg/mL) podem sugerir que a demência e/ou BDNF podem contribuir para o surgimento e/ou agravamento do PB. Em aditamento, os pacientes do grupo DEM/CDR3 - com maior gravidade da DEM – apresentaram níveis séricos de BDNF (23,37 pg/mL) 2,6 vezes mais elevados comparados aos pacientes com PB com DEM (9,1 pg/mL).

Destaca-se que a quantificação do BDNF no grupo DEM foi menor que a do grupo controle, dados que corroboram com a literatura (ADACHI et al., 2014; LASKE et al., 2007; VENTRIGLIA et al., 2013; YASUTAKE et al., 2006). O decréscimo na concentração do peptídeo BDNF na DEM varia em diferentes populações. No nosso estudo a dosagem sérica de BDNF no grupo com DEM foi 25,41 pg/mL e no grupo controle 38,21 pg/mL. No Brasil, Forlenza et al. (2007) encontraram níveis inferiores de BDNF em um grupo de 30 pacientes com DA (581,9 pg/L) comparados ao grupo controle (777,5 pg/L). Na Alemanha, Laske et al. (2007), conduziram um estudo envolvendo 27 pacientes com diagnóstico de Doença Alzheimer (DA) e 28 controles e encontraram níveis séricos de BDNF diminuídos nos pacientes com DA (18,6 ng/mL), comparados aos controles (21,3 ng/mL). Em um estudo Koreano, Lee et al. (2009) relataram baixas dosagens de BDNF em pacientes com DA (22,9 ng/mL) comparada aos controles (27,9 ng/mL).

Os pacientes do grupo DEM foram alocados de acordo com o tipo de demência: 22/50 (44%) pacientes apresentaram demência mista e 28/50 (56%), demência devido à DA.

Ao se comprar os níveis de BDNF, não houve diferença, sugerindo que o biomarcador BDNF não é capaz de distinguir os tipos de DEM.

Ao parear os pacientes do grupo DEM segundo à escala clínica da demência (CDR1, CDR2 e CDR3), observou-se concentrações inferiores de BDNF no subgrupo CDR3 (mediana = 23,37 pg/mL) quando comparado com o subgrupo CDR1 (mediana = 30,17 pg/mL). Laske et al. (2006) conduziram estudo com 30 pacientes que estavam em diferentes estágios de demência devido a doença de Alzheimer, e encontraram concentrações mais baixas de BDNF (17,3 ng/mL) no grupo de pacientes que estavam em estado mais avançado da demência, enquanto que pacientes em estado inicial apresentaram níveis maiores de BDNF (25,1 ng/mL). Assim, pode-se inferir que o BDNF, além de ser um preditor de DEM, pode representar um biomarcador de estadiamento da DEM, visto que a concentração desse peptídeo foi inferior no soro de pacientes que apresentaram grau mais avançado de DEM (CDR3).

Recentemente, Buchman et al. (2016) acompanharam 535 pacientes idosos com avaliações cognitivas anuais, e avaliaram a expressão de BDNF no córtex dorsolateral em necropsia de tecido cerebral dos pacientes que vieram a óbito. Relataram que pacientes com maior comprometimento cognitivo apresentavam redução na expressão do BDNF.

Dentre as variáveis incluídas neste estudo, o gênero diferiu entre os grupos analisados, sendo que, nos grupos PB e DEM, foi incluída maior quantidade de mulheres. Houve relação significativa entre as concentrações de BDNF nos três grupos do estudo com o gênero, sendo que o gênero feminino apresentou concentrações mais elevadas do peptídeo BDNF. Spratt et al., em 2015, relataram em estudo com 36 pacientes com doença de Alzheimer que indivíduos do sexo feminino apresentavam maiores concentrações séricas do BDNF. Em contrapartida com o nosso trabalho, Weinstein et al. (2014), ao analisarem a

concentração sérica de BDNF dos indivíduos no coorte de Framingham, relataram níveis mais baixos desse peptídeo entre as mulheres. Portanto, não podemos relacionar níveis séricos do BDNF à gravidade da DEM em homens ou mulheres.

A idade foi correlacionada com os níveis séricos de BDNF nos grupos de estudo não havendo relação significativa. Portanto, vimos que a idade não está relacionada com a concentração sérica do peptídeo BDNF nas amostras analisadas.

No grupo PB, não houve diferença significativa quando os níveis séricos de BDNF foram avaliados em relação ao tempo de doença. Estar ou não em tratamento imunossupressor no momento da coleta foi correlacionado com os níveis de BDNF, e não observamos diferença estatística.

No nosso estudo, não houve correlação entre os títulos de anticorpos anti-PB180/230 com a concentração do peptídeo BDNF no grupo PB.

Adiciona-se, a hipótese de que anticorpos anti-BP180/230 possam estar se ligando ao BDNF endógeno solúvel, provocando sua diminuição sérica. Para que essa hipótese seja respondida, ensaios de blotting com o peptídeo BDNF e com soro de pacientes com PB, DEM e controles estão sendo preparados.

Além dessa hipótese para a diminuição do peptídeo BDNF sérico no grupo PB, pode-se aventar que o grupo PB represente um marcador oculto da DEM. Porém, no subgrupo PB com DEM e sem DN, não houve diferença estatística. Para tal investigação, maior amostragem se faz necessária.

7. CONCLUSÃO

No grupo PB, houve associação com DN em 26%. Desses, 16% tiveram diagnóstico de DEM; 6% AVC e 4% epilepsia. Observamos dois tipos clínicos de demência: 5/8 (63%) pacientes apresentaram demência vascular e 3/8 (38%) demência por doença de Alzheimer.

Frequência maior de pacientes com positividade para anticorpos IgG anti-BP180 em relação ao anti-BP230 foi identificada no grupo PB, ambos correlacionados com o tempo de doença. Ainda, houve correlação positiva dos anticorpos IgG anti-BP180 com a idade e correlação inversa com o tempo de doença. Marcadores sorológicos anti-BP foram encontrados em 10% do grupo DEM e o marcador anti-BP180 em 14% do grupo controle, corroborando relatos em amostragens de idosos sem apresentarem dermatoses bolhosas.

Dois de dez pacientes do grupo DEM que apresentaram positividade para anti-BP, apresentaram marcação na IFI sugerindo um provável PB subclínico.

A concentração do peptídeo BDNF resultou menor no grupo PB, e, quando em associação com DEM, houve ainda menor dosagem de BDNF. No grupo DEM, a concentração de BDNF foi menor comparada ao grupo controle, podendo ser utilizado como um marcador de estadiamento, porém sem diferenciar os tipos de demência.

Não houve correlação entre os títulos de anticorpos anti-PB180/230 com a concentração do peptídeo BDNF no grupo PB.

Como conclusão final, os marcadores sorológicos para PB não são úteis para o diagnóstico de demências. Os valores séricos baixos de BDNF nos pacientes com PB podem sugerir associação com DEM. O BDNF pode ser utilizado como biomarcador de gravidade da DEM.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, N. et al. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. **World journal of biological chemistry**, v. 5, n. 4, p. 409–28, 2014.

ALLEN, S. J.; WILCOCK, G. K.; DAWBARN, D. Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 264, n. 3, p. 648–51, 1999.

ALPSOY, E.; AKMAN-KARAKAS, A.; UZUN, S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. **Archives of dermatological research**, v. 307, n. 4, p. 291–8, 2015.

APA . DSM-V-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th Edition, Text Revision ed. American Psychiatric Association; Washington, DC: 2014.

ARÉVALO, J. C.; WU, S. H. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1523–37, 2006.

BALARATNASINGAM, S.; JANCA, A. Pharmacology & Therapeutics Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 116–124, 2012.

BASTUJI-GARIN, S. et al. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 3, p. 637–643, 2011.

BAUM S, SAKKA N, ARTSI O, TRAU H, B. A. Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 482–489, 2014.

BEUTNER, E. H.; JORDON, R. E. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. **Experimental Biology and Medicine**, v. 117, p. 505–10, 1964.

BRICK, K. E. et al. A population-based study of the association between bullous pemphigoid and neurologic disorders. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 6, p. 1191–7, 2014.

BRICK K. E. et al. Incidence and Mortality Rates of Bullous Pemphigoid in Olmsted County, Minnesota, Over 6 Decades. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 71, n. 1, p. 92–99, 2014.

CAI, S. C. S. et al. Anti-BP180 NC16A IgG Titres as an Indicator of Disease Activity and Outcome in Asian Patients with Bullous Pemphigoid. **Annals Academy of Medicine**, v. 44,

n. 4, p. 119–126, 2015.

CASAS-DE-LA-ASUNCIÓN, E. et al. Association Between Bullous Pemphigoid and Neurologic Diseases: A Case-Control Study. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 105, n. 9, p. 860–865, 2014.

CHALOVICH, E. M. et al. Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 17870–81, 2006.

CHARNEUX, J. et al. Usefulness of BP230 and BP180-NC16A enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. **Archives of Dermatology**, v. 147, n. 3, p. 286–291, 2011.

CHEN, J. et al. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. **Gerontology**, v. 57, n. 3, p. 211–6, 2011.

CHEVALIER, V. et al. Impact pronostique des maladies neurologiques au cours de la pemphigoïde bulleuse : étude rétrospective de 178 cas. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. pii: S0151, 2016.

CHOSIDOW, O. et al. Bullous pemphigoid and amyotrophic lateral sclerosis: a new clue for understanding the bullous disease? **Archives of Dermatology**, v. 136, n. 10, p. 521–4, 2000.

CLAUDEPIERRE, T. et al. Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: evidence for an anchoring complex in the central nervous system. **The Journal of comparative neurology**, v. 487, n. 2, p. 190–203, 2005.

COELHO, F. G. M. Efeito do treinamento aeróbio nos níveis plasmáticos do fator neurotrófico derivado do cérebro, variáveis metabólicas e funções cognitivas em idosos com a doença de alzheimer. 2014. 138 folhas. **Tese** - Universidade estadual paulista, instituto de biociências do campus de rio claro.

CONNOR, B. et al. Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. **Molecular Brain Research**, v. 42, n. 1, p. 1–17, 1996.

CORDEL, N. et al. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. **Dermatology**, v. 215, n. 3, p. 187–91, 2007.

COZZANI, E. et al. Atypical presentations of bullous pemphigoid: Clinical and immunopathological aspects. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 5, p. 438–45, 2015.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and

memory? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 3, p. 1, 2010.

DĂNESCU, S. et al. Role of physical factors in the pathogenesis of bullous pemphigoid: Case report series and a comprehensive review of the published work. **Journal of Dermatology**, v. 43, n. 2, p. 134-40, 2016.

DEVI, L.; OHNO, M. TrkB reduction exacerbates Alzheimer's disease-like signaling aberrations and memory deficits without affecting β -amyloidosis in 5XFAD mice. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 5, p. 562, 2015.

DI ZENZO, G. et al. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. **The Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 1, p. 103–10, 2004.

DINIZ, B. S.; TEIXEIRA, A. L. Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: Physiopathology and beyond. **NeuroMolecular Medicine**, v. 13, n. 4, p. 217–222, 2011.

EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, p. 257–269, 2003.

ERICKSON, K. I. et al. Genetic contributions to age-related decline in executive function: a 10-year longitudinal study of COMT and BDNF polymorphisms. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 2, p. 11, 2008.

ERICKSON, K. I. et al. BDNF is Associated With Age-Related Decline in Hippocampal Volume. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5368–5375, 2011.

ESMAILI, N. et al. Diagnostic accuracy of BP180 NC16a and BP230-C3 ELISA in serum and saliva of patients with bullous pemphigoid. **Clinical and experimental dermatology**, p. 1–7, 2014.

FINKBEINER, S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. **Neuron**, v. 25, p. 11-14, 2005.

FORLENZA, O. V. et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and serum levels on the progression of mild cognitive impairment. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 11, p. 774-80, 2010.

FÖRSTI, A. K. et al. Increasing incidence of bullous pemphigoid in Northern Finland: a retrospective database study in Oulu University Hospital. **British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 5, p. 1223–1226, 2014.

FOUREUR, N.; DESCAMPS, V.; LEBRUN-VIGNES, B.; PICARD-DAHAN, C.; GROSSIN, M.; BELAICH, S.; CRICKX B. Bullous pemphigoid in a leg affected with

hemiparesia: a possible relation of neurological diseases with bullous pemphigoid? **European Journal of Dermatology**, v. 3, p. 230-3, 2001.

FURUE, M.; KADONO, T. Bullous pemphigoid: What's ahead? **The Journal of Dermatology**, v. 42, p. 1-4, 2015.

GAMMON, W. R. et al. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.32, p. 139-144, 1984.

GIUDICE, G. J. et al. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 10, p. 5742-5750, 1993.

HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. **Annual Review of Pathology**, DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044313, 2016.

HOFMANN, S. et al. Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH2- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 5, p. 1065-73, 2002.

ISHIURA, N. et al. Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. **Journal of Dermatological Science**, v. 49, n. 2, p. 153-61, 2008.

JOLY, P. et al. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 8, p. 1998-2004, 2012.

KASPERKIEWICZ, M.; ZILLIKENS, D.; SCHMIDT, E. Pemphigoid diseases: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Autoimmunity**, v. 45, n. 1, p. 55-70, 2012.

KAREGE, F.; BONDOLFI, G.; GERVASONI, N.; SCHWALD, M.; AUBRY, J. M.; BERTSCHY, G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1068-1072, 2005.

KEIFER, J.; ZHENG, Z.; AMBIGAPATHY, G. A MicroRNA-BDNF Negative Feedback Signaling Loop in Brain : Implications for Alzheimer's Disease. **MicroRNA**, p. 101-108, 2015.

KERSHENOVICH, R.; HODAK, E.; MIMOUNI, D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 477-481, 2014.

KIBSGAARD, L. et al. A Retrospective Consecutive Case-series Study on The Effect of Systemic Treatment, Length of Admission Time, and Co-morbidities in 98 Bullous Pemphigoid Patients Admitted to a Tertiary Centre. **Acta Dermato Venereologica**, v. 95, n. 3, p. 307–311, 2015.

KIM, H. K. et al. Neuropathological relationship between major depression and dementia: A hypothetical model and review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 67, p. 51–57, 2016.

KOIZUMI, H.; HASHIMOTO, K.; IYO, M. Dietary restriction changes behaviours in brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice: role of serotonergic system. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 2335-2344, 2006.

KWAN, Z. et al. The Association Between Bullous Pemphigoid and Neurological Disorders in A Selected Malaysian Population. **Medical Journal of Maylasia**, v. 70, n. 2, p. 81–85, 2015.

LANGAN, S. M. et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. **BMJ**, v. 337, n. jul09 1, p. a180–a180, 2008.

LANGAN, S. M.; GROVES, R. W.; WEST, J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 3, p. 631–6, 2011.

LASKE, C. et al. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 9, p. 1217–1224, 2006.

LASKE, C. et al. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 5, p. 387–394, 2007.

LEE, J. G. et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in elderly korean with dementia. **Psychiatry Investigation**, v. 6, n. 4, p. 299–305, 2009.

LEE, J.; SEROOGY, K. B.; MATTSON, M. P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 539-547, 2002.

LEVER, W. F. Pemphigus. **Medicine**, v. 32, p. 1–123, 1953.

LÉVY-SITBON, C. et al. Assessment of Bullous Pemphigoid Disease Area Index during Treatment : A Prospective Study of 30 Patients. **Dermatology**, v. 229, p. 116–122, 2014.

LJUBOJEVIC, S.; LIPOZENČIĆ, J. Autoimmune bullous diseases associations. **Clinics in**

Dermatology, v. 30, n. 1, p. 17–33, 2012.

LI, L.; CHEN, J.; WANG, B.; YAO, Y.; ZUO, Y. Sera from patients with bullous pemphigoid (BP) associated with neurological diseases recognized BP antigen 1 in the skin and brain. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 160, p. 1343-5, 2009.

LO SCHIAVO, A. et al. Bullous pemphigoid: Etiology, pathogenesis, and inducing factors: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 4, p. 374–381, 2013.

LOMMATZSCH, M. et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 115- 123, 2005.

LU, B. et al. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 401–416, 2013.

MARAZZA, G. et al. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. **The British journal of dermatology**, v. 161, n. 4, p. 861–8, 2009.

MARIOTTI, F. et al. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. **The British journal of dermatology**, v. 151, n. 5, p. 1004–10, 2004.

MARTINEZ-DE PABLO, M. I. et al. Childhood bullous pemphigoid. **Archives of Dermatology**, v. 143, n. 4, p. 215–220, 2007.

MEIJER, J. M. et al. Significantly higher prevalence of circulating bullous pemphigoid-specific IgG autoantibodies in elderly patients with a nonbullous skin disorder. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 5, p. 1274–1276, 2015.

MESSINGHAM, K. A. N. et al. A novel ELISA reveals high frequencies of BP180-specific IgE production in bullous pemphigoid. **Journal of Immunological Methods**, v. 346, p. 18–25, 2009.

MESSINGHAM, K. A. N. et al. Autoantibodies to Collagen XVII Are Present in Parkinson's Disease and Localize to Tyrosine-Hydroxylase Positive Neurons. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 005, p. 2015–2017, 2015.

MICHALSKI, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB expression in the “oldest-old,” the 90+ Study: correlation with cognitive status and levels of soluble amyloid-beta. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 12, p. 3130–3139, 2015.

MINTZ, E. M.; MOREL, K. D. Treatment of Chronic Bullous Disease of Childhood. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 4, p. 699–700, 2011.

MORRIS JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): Current vision and scoring rules *Neurology*, v. 43, p. 2412-14, 1993.

NEAU, J. P.; GODENECHÉ, G.; MATHIS, S.; GUILLET, G. Neurodermatology. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 121, p.1561-94, 2014.

NISHIE, W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, n. 3, p. 179–86, 2014.

NUMAKAWA, T. et al. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 2, p. 237–58, 2010.

OSAWA, M. et al. A case of childhood bullous pemphigoid with IgG and IgA autoantibodies to various domains of BP180. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 6, p. e129–e131, 2014.

PAN, W.; BANKS, W. A.; FASOLD, M. B.; BLUTH, J.; KASTIN, A. J. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 37 ,p. 1553-1561, 1998.

PANG, P. T. et al. Hippocampal Plasticity Cleavage of proBDNF by tPA / Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity. **Science**, v. 306, p. 487-91, 2004.

PARKER, S. R. S.; MACKELFRESH, J. Autoimmune blistering diseases in the elderly. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 1, p. 69–79, 2011.

PEDERSEN, B. K. et al. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. **Experimental Physiology**, v. 94, p. 1153–60, 2009.

PHOON, Y. W.; FOOK-CHONG, S. M.; KOH, H. Y.; THIRUMOORTHY, T.; PANG, S. M.; LEE, H. Y. Infectious complications in bullous pemphigoid: an analysis of risk factors. **JAMA Dermatology**, v. 72, p. 834-9, 2015.

PIETKIEWICZ, P. et al. Bullous pemphigoid and neurodegenerative diseases: a study in a setting of a Central European university dermatology department. **Aging Clinical and Experimental Research**, 2015.

POST, R. M. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: Clinical and theoretical implications. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, p. 979–990, 2007.

PRÜMANN, W. et al. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, n. 63, p. doi: 10.1186/s13023–015–

0278–x., 2015.

ROUSSEL, A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. **Archives of Dermatology**, v. 147, n. 3, p. 293–298, 2011.

SAKUMA-OYAMA, Y. et al. Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. **The British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 1, p. 126–31, 2004.

SCHMIDT, E.; DELLA TORRE, R.; BORRADORI, L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 3, p. 427–38, viii–ix, 2012.

SCHMIDT, E.; ZILLIKENS, D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 2, p. 84–89, 2010.

SCHMIDT, E.; ZILLIKENS, D. Pemphigoid diseases. **The Lancet**, v. 381, n. 9863, p. 320–332, 2013.

SPRATT, E. et al. Pilot Study and Review: Physiological Differences in BDNF, a Potential Biomarker in Males and Females with Autistic Disorder. **International Neuropsychiatric Disease Journal**, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2015.

TAO, X.; FINKBEINER, S.; ARNOLD, D. B.; SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, v. 20, p. 709–26, 1998.

TARAZONA, M. J. M. et al. Bullous pemphigoid and neurological disease: statistics from a dermatology service. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 2, p. 280–282, 2015.

TEIXEIRA, V. B. et al. Bullous pemphigoid and comorbidities: a case-control study in Portuguese patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 274–8, 2014.

UJIE, H.; NISHIE, W.; SHIMIZU, H. Pathogenesis of bullous pemphigoid. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 3, p. 439–46, ix, 2011.

VAN BEEK, N. et al. Serum autoantibodies against the dermal-epidermal junction in patients with chronic pruritic disorders, elderly individuals and blood donors prospectively recruited. **The British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 4, p. 943–7, 2014.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. **Neuroscience**, v. 122, p. 647–657, 2003.

VENTRIGLIA, M. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in different neurological diseases. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 901082, 2013.

WADA, M. et al. Epitope-dependent pathogenicity of Abs targeting a major bullous pemphigoid autoAg collagen XVII/BP180. **Journal of Investigative Dermatology**, pii: S0022-202X(16)00362-6. doi: 10.1016/j.jid.2015.11.030, 2016.

WEINSTEIN, G. et al. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor and the risk for dementia. **JAMA Neurology**, v. 71, n. 1, p. 55–61, 2014.

WONG, J. Neurotrophin signaling and Alzheimer' s Disease neurodegeneration - Focus on BDNF / TrkB signaling. **Trends in cell signaling pathways in neuronal fate decision**, p. 181 – 194, 2013.

YANG, J. et al. Neuronal release of proBDNF. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 113–115, 2009.

YASUTAKE, C. et al. Serum BDNF, TNF- α and IL-1 β levels in dementia patients. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 7, p. 402–406, 2006.

ZANELLA, R. R. et al. Bullous pemphigoid in younger adults: three case reports. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 355–358, 2011.

ZILLIKENS, D. et al. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 4, p. 573–9, 1997.

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Tabela completa referente à revisão da literatura dos biomarcadores sorológicos para doenças neurológicas

Tabela 1. Revisão da literatura sobre biomarcadores de doenças neurológicas

Doenças Neurológicas	Biomarcador	Amostra	Amostragem	Observações	Referências
ALZHEIMER	Serum Amyloid P	Soro Plasma Líquor	51 DA/ 50 C	<ul style="list-style-type: none"> Kit ELISA comercial disponível. Níveis aumentados em DA ($p < 0,005$; U Mann-Whitney) 	<i>Hawkins et al., 1994</i> (UK)
	α 1 Anti-tripsina	Plasma	9 DA/ 9 C	<ul style="list-style-type: none"> Plasma não disponível. Medição do nível de oxidação da proteína. 	<i>Choi et al., 2002</i> (USA)
		Soro	10 DA/ 9 MCI	<ul style="list-style-type: none"> Proteoma. Confirmado através de diferentes ferramentas proteômicas. (1D-Eletroforese, 2-D Eletroforese, ELISA, IB, etc.) 	<i>Yu et al., 2003</i> (Canadá)
			10 DA/ 10 C	<ul style="list-style-type: none"> Proteoma. Confirmado através de diferentes ferramentas proteômicas. (1D-Eletroforese, 2-D Eletroforese, ELISA, IB, etc.) 	<i>Liao et al., 2007</i> (Taiwan)

ALZHEIMER	α-2 macroglobulina (A2M)	Soro	5 DA / 5 C	<ul style="list-style-type: none"> • Proteoma. • Confirmado através de diferentes ferramentas proteômicas. (1D-Eletroforese, 2-D Eletroforese, ELISA, IB) 	<i>Zhang et al.</i> , 2004 (Canada)
		Plasma	13 DA / 13 MCI	<ul style="list-style-type: none"> • Fold = 8,83 • Correlação com atividade do Hipocampo. 	<i>Thambisetty et al.</i> 2008 (UK)
		Soro	197 DA / 203 C	<ul style="list-style-type: none"> • SAM t = 2,09 / Fold = 2,45 	<i>O'Bryant et al.</i> , 2010 (USA)
	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	Soro Líquor	60 DA/ 33 C	<ul style="list-style-type: none"> • Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Yasatuke et al.</i> , 2006 (Japão)
			27 DA/ 28 C	<ul style="list-style-type: none"> • Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Laske et a.</i> , 2007 (Alemanha)
			266 DA/ 169 C	<ul style="list-style-type: none"> • Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Ventriglia et al.</i> , 2013 (Itália)
	Fator H Complemento	Soro	Amostragem não descrita	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção MS/MS 	<i>Zhang et al.</i> , 2004 (Toronto, Canadá)
		Plasma	50 DA/ 50 C	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma não disponível. • Análise por cromatografia. 	<i>Hye et al.</i> , 2006 (UK)
			13 DA/ 13 MCI	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma não disponível. 	<i>Thambisetty et al.</i> , 2008

ALZHEIMER					(UK)
			7 DA/ 7 C	<ul style="list-style-type: none"> Análise por cromatografia. Plasma não disponível. 	<i>Henkel et al.</i> , 2012 (Alemanha)
	Polipeptídio pancreático	Soro	197 DA / 203 C	<ul style="list-style-type: none"> SAM t = 2,10 / Fold = 1,33 	<i>O'Bryant et al.</i> , 2010 (USA)
		Plasma	207 DA/ 754 C	<ul style="list-style-type: none"> Plasma não disponível. Fold = 1,54 	<i>Doecke et al.</i> , 2012 (Australia)
			112 DA / 396 MCI / 58 C	<ul style="list-style-type: none"> Plasma não disponível. Não significativa (p <05) análise covariância entre grupos. 	<i>Soares et al.</i> , 2012 (USA)
			101 AD / 195 MCI / 56 C	<ul style="list-style-type: none"> Plasma não disponível. OR = 1,12. Regressão linear, R²=0,34 	<i>Hu et al.</i> , 2012 (USA)
	Klotho	Soro	Modelo animal de Alzheimer (Camundongos)	<ul style="list-style-type: none"> <u>GenKlotho</u>: aging – supresor. <u>Proteína Klotho</u>: supressor do estresse oxidativo. Kit ELISA comercial disponível. Klotho em humanos? 	<i>Kuang et al.</i> , 2014
	Beta amiloid	Plasma	211 DA/ 133 MCI/ 768 C	<ul style="list-style-type: none"> Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Rembach et al.</i> , 2014 (Austrália)

PARKINSON	Fator Neutrotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	Soro Líquor	30 PD/ 169 C	<ul style="list-style-type: none"> Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Ventriglia et al., 2013 (Itália)</i>
	Fator H do Complemento	Soro	337 DEM/ 132 C	<ul style="list-style-type: none"> Deteção da proteína por Fluorescendestain 	<i>Goldknopf et al., 2009 (USA e Grécia)</i>
		Plasma	45 DP/ 45 C	<ul style="list-style-type: none"> Plasma não disponível. Deteção da proteína por UVP e LC-MS/MS 	<i>Alberio et al., 2013 (Itália)</i>
	Isoforma DJ-1	Soro Líquor	75 DP/14 DA/ 30 C	<ul style="list-style-type: none"> Estágios tardios/ Análise por MS 	<i>Lin et al., 2012 (USA)</i>
	SerumAmyloid P	Plasma	36 DP/ 16 C	<ul style="list-style-type: none"> Deteção da proteína por LC-MS/MS 	<i>Chen et al., 2011 (Taiwan)</i>
	SerumAlbumin	Plasma	45 DP/ 45 C	<ul style="list-style-type: none"> Plasma não disponível. Deteção da proteína por UVP e LC-MS/MS 	<i>Alberio et al., 2013 (Itália)</i>
ESCLEROSE MÚLTIPLA	Anti- MOG e anti-MBP	Soro	261 EM	-	<i>Egg et al., 2001 (Alemanha)</i>
			103 EM	-	<i>Berger et al., 2003 (Austria)</i>

ESCLEROSE MÚLTIPLA	Osteopontin	Plasma	17 EM/ 11 EMR/ 20 C	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção por ELISA 	<i>Shimizu et al., 2013</i> (Tokyo)
	AOPP (advancedoxidatio nproteinproducts)	Plasma	60 EM/ 81C	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma não disponível. • Detecção da proteína por espectrometria. 	<i>Pasquali et al., 2014</i> (Itália)
			29 EM/ 29 C	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma não disponível. • Detecção da proteína por espectrometria. 	<i>Karlík et al., 2014</i> (Eslováquia)
AVC	Proteína S-100	Soro	36 AVC	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção por radioimunoensaio 	<i>Kim et al., 1996</i> (Coreia do Sul)
			32 AVC	<ul style="list-style-type: none"> • Imunoluminescênciasanduíche 	<i>Wunderlich et al., 2004</i> (Alemanha)
	PeptídeoNatriurét ico Cerebral tipo B	Plasma	30 AVC/ 30 C	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma não disponível. 	<i>Giannakoulas et al., 2005</i> (Grécia)
	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	Soro Líquor	60 AVC/ 33 C	<ul style="list-style-type: none"> • Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Yasatuke et al., 2006</i> (Japão)
			91 AVC/ 169 C	<ul style="list-style-type: none"> • Kit ELISA comercial disponível. 	<i>Ventriglia et al., 2013</i> (Itália)
	PARK7	Plasma	622 AVC/ 165 C	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma não disponível. • Detecção por ELISA. 	<i>Allard et al., 2005</i> (Geneva e San Diego)

DA- Doença de Alzheimer, DP- Doença de Parkinson, C- controles (saudáveis), MCI- comprometimento cognitivo leve; AVC- Acidente vascular cerebral

ANEXO 2 - Tabela completa referente à revisão da literatura da associação do pb com doenças neurológicas

Tabela 2. Revisão da literatura sobre associação do penfigoide bolhoso (PB) com desordens neurológicas

Referência	País de Estudo	Tipo de Estudo	Amostragem de PB	Total de Doenças Neurológicas OR (95% IC) ou % (95% IC)	Doenças Neurológicas relacionadas	OR (95% IC) ou % (95% IC)
Foureur et al., 2001	França	Retrospectivo (Caso – Controle)	46	-	Demência Senil Alzheimer AVC	Dados escassos Dados escassos Dados escassos
Stinco et al., 2005	Itália	Retrospectivo	238	62 (12-594)	Esclerose múltipla (EM) Doença de Parkinson (DP)	17,6/10.000 casos 24,7/10.000 casos
Cordel et al., 2007	França	Retrospectivo	341	36%	Demência AVC Doença de Parkinson Outras	20% (16 – 25) 15% (11 – 19) 9% (7 – 13) <5%
Jedlickova et al., 2010	República Checa	Retrospectivo (Caso – Controle)	89	42,7%	Demência AVC	Dados escassos Dados escassos
Taghipour et al., 2010	UK	Retrospectivo (Caso – Controle)	90	46%	Demência Doença cerebrovascular Doença de Parkinson Epilepsia Outras	7,9 (1,7 – 37,3) 6,0 (2,6 – 13,6) 2,6 (0,6 – 11,4) 7,8 (0,8 – 72,4) 2,1 (0,3 – 13,6)

Langan et al., 2011	UK	Retrospectivo (Caso – Controle)	868	36%	Demência Doença de Parkinson AVC Epilepsia Esclerose Múltipla	3,3 (2,3 – 4,6) 2,9 (1,7 – 4,9) 1,8 (1,3 – 2,4) 1,7 (1,0 – 2,9) Dados escassos
Bastuji – Garin et al., 2011	França	Prospectivo (Caso – Controle)	201	-	Doença de Parkinson Transtorno uni e bipolar	2,1 (1,0 – 4,2) 5,2 (1,2 – 22,8)
Chen et al., 2011	China	Retrospectivo (Caso – Controle)	3485	24,2%	Demência AVC Esquizofrenia Epilepsia	4,8 (4,2 – 5,4) 3,3 (3,0 – 3,6) 2,5 (1,5 – 4,3) 3,9 (3,2 – 4,8)
Cortés et al., 2012	Itália	Retrospectivo	60	18,3%	Demência	4,8 (2,0 – 11,5)
Li et al., 2013	China	Retrospectivo (Caso – Controle)	190	16%	Doença Neurológica	1,9 (1,0 – 3,6)
Texeira et al., 2014	Portugal	Retrospectivo (Caso – Controle)	77	55,8%	AVC Demência Doença de Parkinson	8,1 (3,8 – 17,2) 5,2 (2,7 – 10,1) 4,9 (0,8 – 27,4)
Brick et al., 2014	USA	Retrospectivo (Caso – Controle)	87	6,85 (3,0-15,64)	Demência Doença de Parkinson Esclerose Múltipla Doença cerebrovascular	9,0 (0,9 – 86,5) 6,7 (2,0 – 21,9) 3,0 (0,1 – 47,9) 3,0 (0,8 – 10,3)
Casas-de-la-Asunción et al., 2014	Espanha	Retrospectivo (Caso – Controle)	56	6.70 (3.27-13.71)	Demência Doença de Parkinson Doença cerebrovascular	5.87 (1.75-19.68) 5.87 (1.75-19.68) 3.12 (1.23-7.94)
Phoon et al., 2015	Singapura	Retrospectivo (Caso – Controle)	97	-	Demência Doença de Parkinson AVC	4.2 (1.2-14.7) Dados escassos 0.8 (0.2-2.4)

Tarazona et al., 2015	Brasil	Retrospectivo	40	36%	Demência	22,2%
					Epilepsia	11,1%
					AVC	44,4%
					Síndrome do pânico	11,1%
					Depressão	11,1%
Kibsgaard et al, 2015	Dinamarca	Retrospectivo (Relato de casos)	98	37%	Demência	Dados escassos
					Doença de Parkinson	Dados escassos
					Esclerose Múltipla	Dados escassos
Pietkiewicz et al., 2015	Europa	Retrospectivo	94	27,7%	Demência	5,32%
					Doença de Parkinson	5,32%
					Doença cerebrovascular	12,77%
Kwan et al., 2015	Malásia	Retrospectivo (Caso – Controle)	43	44,2%	Demência	20,9%
					Doença de Parkinson	2,3%
					AVC	30,2%
					Epilepsia	4,7%
Chevalier et al., 2016	França	Retrospectivo (Caso – Controle)	178	47,2%	Demência	24,2%
					Doença de Parkinson	8,4%
					AVC	15,1%
					Esclerose	1,1%

ANEXO 3 - Termo de aprovação do comitê de ética humano

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Marcador BDNF de demência como fator preditor para o desenvolvimento de penfigoide bolhoso: um estudo caso-controle

Pesquisador: TAMIRIS AMANDA JULIO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45779715.5.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.354.403

Apresentação do Projeto:

Estudo caso-controle composto por 3 grupos: (1) 50 pacientes com penfigoide bolhoso (PB), (2) 50 pacientes com doenças neurológicas (DN) (em especial demência), e (3) 50 controles com idade superior a 45 anos, que serão entrevistados no ambulatório de catarata do HC-FMRP/USP. Será realizado ensaio ELISA para determinar o marcador sorológico BDNF, envolvido na maioria das doenças neurológicas degenerativas. Em paralelo, será verificada a expressão de anticorpos anti-BP230 e anti-BP180 nos 3 grupos de pacientes, também por ensaio ELISA. A análise dos dados se dará de forma longitudinal retrospectiva, com o intuito de estimar o risco do desenvolvimento de PB em pacientes com diminuição da proteína BDNF, assim como o risco de desenvolver PB nos pacientes com DN e controles pela presença de autoanticorpos circulantes contra BP 180 e 230.

Objetivo da Pesquisa:

O principal objetivo deste estudo é avaliar a detecção sorológica do marcador BDNF de demência como preditor do PB. São objetivos específicos: (a) determinar a prevalência de demência e Alzheimer na amostragem de pacientes com PB atendidos no ambulatório de Dermatologia do HC-FMRP/USP, em corte transversal; (b) quantificar o marcador sorológico BDNF para demência nos grupos de pacientes com PB, demência e controle; (c) quantificar os anticorpos contra BP230 e

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.354.403

BP180 (ensaio ELISA de kit comercial) nos grupos PB, DN e controle; (d) correlacionar os marcadores sorológicos BDNF, e BP 230 e 180 com demência e PB e (e) avaliar se amostras de soro de pacientes dos grupos DN e controle reconhecem proteínas da pele humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: os riscos são relacionados a coleta sanguínea, que inclui dor e pequena reação no local da coleta.

Benefícios: não há benefícios diretos aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentam as novas versões do TCLE, orçamento, aprovação pela Unidade de Pesquisa Clínica local, cronograma, planilhas de extração, folha de rosto. Estes documentos são adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2 de 30/11/2015, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão de 30/11/2015 podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.354.403

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_451318.pdf	02/12/2015 17:34:35		Aceito
Outros	Resposta_Parecerista_Tamiris_Julio.pdf	02/12/2015 17:33:56	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Tamiris_Julio_versao2.pdf	02/12/2015 17:24:05	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES_versao2.pdf	02/12/2015 17:23:38	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB_DN_versao2.pdf	02/12/2015 17:22:31	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	UPC.pdf	03/06/2015 12:12:50		Aceito
Outros	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.pdf	14/04/2015 16:26:53		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Mestrado.pdf	14/04/2015 16:23:56		Aceito
Outros	Ficha de Extração_Pacientes Geriátricos.pdf	14/04/2015 16:20:29		Aceito
Outros	Ficha de Extração_Pacientes com Penfigoide.pdf	14/04/2015 16:19:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE .pdf	14/04/2015 16:15:11		Aceito
Outros	Orçamento.pdf	14/04/2015 16:14:50		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	14/04/2015 16:06:31		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.354.403

RIBEIRÃO PRETO, 07 de Dezembro de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO 4 – Escala clínica da demência

	Saudável CDR 0	Demência questionável CDR 0,5	Demência leve CDR 1	Demência moderada CDR 2	Demência grave CDR 3
MEMÓRIA	Sem perda de memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; "esquecimento benigno"	Perda de memória moderada, mais acentuada para fatos recentes; o déficit interfere com atividades do dia a dia	Perda de memória grave; apenas material <i> muito </i> aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem
ORIENTAÇÃO	Plenamente orientado	Plenamente orientado	Dificuldade moderada com as relações de tempo; orientado no espaço no exame, mas pode ter desorientação geográfica em outros locais	Geralmente desorientado	Orientação pessoal apenas
JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	Resolve bem problemas do dia a dia, juízo crítico é bom em relação ao desempenho passado	Leve comprometimento na solução de problemas, semelhanças e diferenças	Dificuldade moderada na solução de problemas, semelhanças e diferenças; julgamento social geralmente mantido	Gravemente comprometido para solução de problemas, semelhanças e diferenças. Juízo social geralmente comprometido	Incapaz de resolver problemas ou de ter qualquer juízo crítico
ASSUNTOS NA COMUNIDADE	Função independente na função habitual de trabalho, compras, negócios, finanças, e grupos sociais	Leve dificuldade nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente e nestas atividades embora ainda possa desempenhar algumas; pode parecer normal à avaliação superficial	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora de casa	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece muito doente para ser levado a atividades fora de casa
LAR E PASSATEMPOS	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais mantidos	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais levemente afetados	Comprometimento leve, mas evidente em casa; abandono das tarefas mais difíceis; passatempos e interesses mais complicados são também abandonados	Realiza as tarefas mais simples. Interesses muito limitados e pouco mantidos	Sem qualquer atividade significativa em casa
CUIDADOS PESSOAIS	Plenamente capaz	Plenamente capaz	Necessita assistência ocasional	Requer assistência no vestir e na higiene	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais. Geralmente incontinente

Adaptado de MORRIS, 1993.

ANEXO 5 – Modelo da ficha do mini exame do estado mental utilizada para avaliação mental dos pacientes do grupo demência e controle

<p>FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO</p>	<p>ESCALAS DE AVALIAÇÃO EM GERIATRIA</p> <p>Divisão de Clínica Médica e Geriatria - Departamento de Clínica Médica -</p>	
Escolaridade: Examinador: Data: / /		
<p>Escore</p> <p style="text-align: center;">ORIENTAÇÃO</p> <p>5 () ano-mês - dia do mês - dia da semana - hora aproximada 5 () estado - cidade - bairro - hospital - andar ou setor</p> <p style="text-align: center;">REGISTRO</p> <p>3 () pente - vaso - laranja</p> <p style="text-align: right;">Tentativas:</p> <p style="text-align: center;">ATENÇÃO E CÁLCULO</p> <p>5 () seriado descendente de 7: 93,86,79,72,65 ou soletrar "mundo" de trás para frente</p> <p style="text-align: center;">EVOCAÇÃO</p> <p>3 () repetir as 3 palavras dadas para registro</p> <p style="text-align: center;">LINGUAGEM</p> <p>9 () - denominar um relógio de pulso e uma caneta (2 pontos) - repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto) - atender ao comando 3-estágios: "Pegue o papel com a mão direita, dobre-o ao meio e ponha-o no chão" (3 pontos) - ler e obedecer o seguinte: FECHÉ OS OLHOS (1 ponto) - escrever uma frase (1 ponto): _____ - copiar o desenho (1 ponto)</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> </div> <p>Escore total: (máx. 30 pontos)</p>		

- HC. 31.154 i -