

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

NATASHA FAVORETTO DIAS DE OLIVEIRA

**Avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitoides  
em pacientes com eritema polimorfo recorrente**

**São Paulo**

**2024**

NATASHA FAVORETTO DIAS DE OLIVEIRA

**Avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitoides  
em pacientes com eritema polimorfo recorrente**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Aoki

Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11

**São Paulo**

**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dias de Oliveira, Natasha Favoretto

*Avaliação in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitoides em pacientes com eritema polimorfo recorrente / Natasha Favoretto Dias de Oliveira; Valéria Aoki, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Dermatologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.  
Versão corrigida.

1. Células dendríticas 2. Eritema multiforme 3. Imuno-histoquímica 4. Receptores Toll-like 5. Interleucinas 6. Imunidade inata. I. Aoki, Valeria, orient. II. Título

USP/FM/DBD-509/23

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: DIAS DE OLIVEIRA, Natasha Favoretto

Título: Avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitoides em pacientes com eritema polimorfo recorrente

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho **Daniel**, que tão pequeno já me ensinou e transformou tanto, e é minha inspiração diária.

Ao meu marido **Walter**, companheiro desde o início dessa jornada nos primeiros anos da Faculdade de Medicina, que acompanhou e me apoiou em cada passo, amenizou cada obstáculo e me fortaleceu a cada dia. Obrigada por fazer esse caminho tão feliz, pelo seu amor, paciência, cuidado, parceria, e sobretudo pela nossa família.

Aos meus pais **Naéde e Luís Antônio**, pelo amor e suporte sempre incondicionais, por todo o cuidado e estímulo desde sempre. Obrigada por cada oportunidade que me trouxe até aqui, vocês sempre foram meus maiores incentivadores.

Ao meu irmão **Rodrigo**, parceiro de toda a vida, que participou de cada etapa desafiadora e me inspira a ser uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que guiou os meus passos, me deu saúde e forças em cada etapa.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Valeria Aoki, que me acolheu como sua aluna e foi verdadeiramente professora em cada momento. Obrigada por tantos ensinamentos, e sobretudo por fazer essa jornada tão leve e alegre.

À Prof. Dra. Claudia Giuli Santi, grande inspiradora para o estudo desse tema. Obrigada por me ensinar desde os primeiros dias da residência e por me ajudar a ampliar meus limites a cada dia para ser também uma médica melhor.

Às Prof. Dras. Denise Miyamoto e Celina Maruta, que me receberam em seus ambulatórios e me apoiaram para meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof. Dra. Raquel Orfali, por todos os ensinamentos sobre estatística, que foram essenciais para a execução desse projeto.

À Prof. Dra. Mirian Sotto, pelo cuidado com os testes imuno-histoquímicos e pelas contribuições com a minha tese.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, que pacientemente me ensinou cada passo para a leitura e quantificação dos resultados imuno-histoquímicos, fundamentais para a realização desse estudo.

À equipe do Museu da Patologia, que tanto me ajudou através do escaneamento das lâminas de imuno-histoquímica.

À equipe do LIM 56, especialmente à Dra. Naiura Vieira, por toda a ajuda com a realização dos testes imuno-histoquímicos, e em tantas etapas importantes.

Aos meus familiares e amigos queridos, pelo apoio e incentivo, especialmente meus sogros Regina e Walter, que ajudaram tanto nesse processo, e minha querida amiga Alessandra Anzai, que dividiu comigo os desafios desse caminho.

Ao Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que me formou e do qual tanto me orgulho. É uma

honra enorme ter tido a oportunidade de conviver com tantas pessoas brilhantes, que tanto admiro.

Aos pacientes, que com sua enorme generosidade motivaram e possibilitaram esse estudo.

Aos professores da banca examinadora, que disponibilizaram seu tempo e atenção para avaliar a minha tese.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Funaro VMBO, coordenadora; Funaro VMBO, Pestana MC, Dziabas MCC, Garcia EM, Santos MF, Nascimento MM, Cardoso SC. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver). 3. ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100 p.: il. -- (Cadernos de estudos; 9).

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

## RESUMO

Dias de Oliveira NF. Avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitoides em pacientes com eritema polimorfo recorrente [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

O eritema polimorfo é uma dermatose caracterizada por lesões simetricamente distribuídas do tipo máculas, pápulas, bolhas e lesões em alvo, que pode acometer a pele e/ou mucosas. O Eritema Polimorfo Recorrente é caracterizado pela recorrência dos surtos ao longo do tempo, com uma média de seis episódios por ano e duração média da doença de 6 a 10 anos. A fisiopatologia da doença ainda não é completamente compreendida. Estima-se que mais de 60% dos casos sejam causados por infecção pelo vírus do herpes simples e há evidências de que o eritema polimorfo recorrente seja um tipo de reação de hipersensibilidade tardia. Do ponto de vista clínico, o curso prolongado e com recidivas do Eritema Polimorfo Recorrente são um desafio terapêutico para o controle da doença. As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) fazem parte da família das células dendríticas e detectam as infecções virais através do reconhecimento dos ácidos nucleicos virais, constituindo importantes mediadoras da imunidade antiviral. O interferon tipo I derivado dessas células, além de inibir diretamente a infecção viral, também ativa as funções antivirais de outros tipos celulares, como das células *natural killer* (NK), células dendríticas mieloides, linfócitos B e T, iniciando e orquestrando a imunidade antiviral inata e adaptativa. Assim sendo, alterações no recrutamento e/ou no funcionamento das pDCs poderiam elucidar a persistência da infecção herpética e a resposta inflamatória que resulta nas lesões de Eritema Polimorfo Recorrente. Neste trabalho descrevo projetos científicos desenvolvidos no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, realizados no período de 2015 a 2023, que tiveram os objetivos de propor um protocolo de tratamento para os pacientes com Eritema Polimorfo Recorrente e de auxiliar na elucidação sobre a fisiopatologia da doença, através da avaliação da presença e da atividade *in situ* das células dendríticas plasmocitoides no Eritema Polimorfo Recorrente. Primeiramente, publicamos uma revisão sobre células dendríticas plasmocitoides na dermatologia. A atuação dessas células na conexão entre as imunidades inata e adaptativa e o fato de não estarem presentes na pele normal, mas sim infiltrarem a pele em diversas doenças dermatológicas - como infecções virais, doenças inflamatórias, doenças autoimunes e neoplásicas - podem indicar sua participação na patogênese dessas dermatoses. Estudos futuros sobre a atuação das

células dendríticas plasmocitoides na dermatologia poderão levar a novos alvos terapêuticos. Em seguida, publicamos o primeiro protocolo terapêutico de longo prazo para remissão do Eritema Polimorfo Recorrente. Nesse artigo, avaliamos as características clínicas e demográficas dos pacientes com Eritema Polimorfo Recorrente diagnosticados entre janeiro de 2000 e dezembro de 2019. Dos 35 pacientes incluídos, 71,4% eram do sexo feminino, a idade média de início da doença foi de 35,7 anos e o seguimento médio foi de 7,58 anos. O local mais acometido foi a pele, em 91,4% dos pacientes. A sorologia para imunoglobulina G para o vírus do herpes simples foi positiva em 91,1% dos casos. O tratamento com aciclovir foi utilizado em 33 dos 35 pacientes, com remissão completa em 22 dos 33 após o primeiro curso terapêutico; 16 de 22 recidivaram e necessitaram de um segundo ciclo de aciclovir. Devido à resposta parcial ao aciclovir, o tratamento combinado com dapsona foi necessário em 9 dos 33 pacientes, e a talidomida foi utilizada como medicamento adjuvante em 4 dos 33, após efeitos adversos à dapsona. Após o primeiro ciclo de aciclovir (com ou sem terapia combinada) 19 dos 33 pacientes tiveram recidiva e receberam de 2 a 6 ciclos adicionais de tratamento. Nossos resultados sugeriram que o Eritema Polimorfo Recorrente é uma doença crônica e apresenta boa resposta ao aciclovir em monoterapia ou em terapia combinada com dapsona ou talidomida na maioria dos pacientes. Por fim, realizamos a avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitoides na pele de pacientes com Eritema Polimorfo Recorrente. Analisamos, através de técnica imuno-histoquímica, a expressão de receptor da cadeia alfa da interleucina-3 (CD123), *Toll-like receptor 7* (TLR7), *Toll-like receptor 9* (TLR9), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e proteína de resistência a myxovirus A (MxA) na pele de 19 pacientes com Eritema Polimorfo Recorrente e de 9 controles saudáveis. Nossos resultados demonstraram - tanto na epiderme quanto na derme - que o grupo dos pacientes com Eritema Polimorfo Recorrente apresentou aumento da expressão *in situ* de CD123, redução da expressão de TLR9, TLR7, IL-6 e TNF- $\alpha$  sem diferenças e MxA aumentada, em comparação com o grupo de controles saudáveis. Assim, demonstramos que as células dendríticas plasmocitoides estão presentes no Eritema Polimorfo Recorrente, mas com ativação reduzida através das vias TLR7 e TLR9, possivelmente afetando a produção inicial de interferon tipo I, beneficiando a persistência do vírus do herpes simples e a recorrência dos episódios de Eritema Polimorfo Recorrente. Esses achados apoiam estudos adicionais para esclarecer o papel das vias TLR7/TLR9 e das células dendríticas plasmocitoides como parte da fisiopatologia do Eritema Polimorfo Recorrente e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** Células dendríticas. Eritema multiforme. Imuno-histoquímica. Receptores Toll-like. Interleucinas. Imunidade inata.

## ABSTRACT

Dias de Oliveira NF. *In situ* evaluation of phenotypical and functional profile of plasmacytoid dendritic cells in patients with recurrent erythema multiforme [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Erythema Multiforme is a dermatosis characterized by symmetrically distributed macules, papules, blisters, and target lesions, affecting the skin and/or mucous membranes. Recurrent Erythema Multiforme is characterized by the recurrence of outbreaks over time, with an average of six episodes per year and a mean disease duration of 6 to 10 years. The pathophysiology of the disease is not completely understood. It is estimated that more than 60% of the cases are caused by herpes simplex virus infection and there is evidence that Recurrent Erythema Multiforme is a type of delayed hypersensitivity. Clinically, the prolonged and relapsing course of Recurrent Erythema Multiforme constitutes a therapeutic challenge for disease control. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are part of the dendritic cell family and detect viral infections through the recognition of viral nucleic acids, constituting important mediators of antiviral immunity. Type I interferon derived from these cells, in addition to directly inhibiting viral infection, also activates the antiviral functions of other cell types, such as natural killer cells, myeloid dendritic cells, B and T lymphocytes, initiating and orchestrating innate and adaptive antiviral immunity. Therefore, changes in the recruitment and/or functioning of pDCs could elucidate the persistence of herpetic infection and the inflammatory response that results in Recurrent Erythema Multiforme lesions. In this paper, we describe scientific projects developed at the Department of Dermatology, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, from 2015 to 2023, which had the objectives of proposing a treatment protocol for patients with Recurrent Erythema Multiforme and to advance in the elucidation of the disease's pathophysiology, through the evaluation of the *in situ* presence and activity of plasmacytoid dendritic cells in Recurrent Erythema Multiforme. First, we published a review on plasmacytoid dendritic cells in dermatology. The role of these cells in the connection between innate and adaptive immunity, and the fact that they are absent in normal skin but infiltrate the skin in various dermatological diseases - such as viral infections, inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases- may indicate their participation in the pathogenesis of several dermatosis. Future studies about the role of plasmacytoid dendritic cells in dermatology could lead to new therapeutic targets. We also published the first long-term treatment protocol for Recurrent

Erythema Multiforme remission. In this article, we evaluated the clinical and demographic characteristics of Recurrent Erythema Multiforme patients, between January 2000 and December 2019. Thirty-five patients were included, 71.4% were female, the average disease onset age was 35.7 years, and the mean follow-up was 7.58 years. The most affected site was the skin, in 91.4% of patients. Herpes simplex virus immunoglobulin G serology was positive in 91.1% of cases. Acyclovir treatment was used in 33 of 35 patients, with complete remission achieved in 22 of 33 after the first therapeutic course; 16 of 22 relapsed and required a second acyclovir cycle. Due to partial response to acyclovir, combined treatment with dapsone was necessary in 9 of 33 patients, and thalidomide was an adjuvant drug in 4 of 33, after adverse effects to dapsone. After the first cycle of acyclovir (with or without combined therapy), 19 of 33 patients relapsed and received 2 to 6 additional treatment cycles. Our results suggested that Recurrent Erythema Multiforme is a chronic disease with a good response to acyclovir in monotherapy or in combined therapy with dapsone or thalidomide in most patients. Finally, we performed an *in situ* evaluation of the phenotypic and functional profile of plasmacytoid dendritic cells in the skin of patients with Recurrent Erythema Multiforme. We analyzed, through immunohistochemistry, the expression of interleukin-3 receptor alpha chain (CD123), Toll-like receptors (TLR)7 and 9, interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and myxovirus resistance protein A (MxA) in the skin of 19 patients with Recurrent Erythema Multiforme and 9 healthy controls. Our results demonstrated - both in the epidermis and dermis - that the group of patients with Recurrent Erythema Multiforme presented increased *in situ* expression of CD123, reduced expression of TLR9, TLR7, IL-6 and TNF- $\alpha$  without differences and increased MxA, compared to the group of healthy controls. Thus, we demonstrated that plasmacytoid dendritic cells are present, but with reduced activation through TLR7/TLR9 pathway in Recurrent Erythema Multiforme, possibly affecting the initial production of type I interferon, benefiting herpes simplex virus persistency and Recurrent Erythema Multiforme outbreaks. These findings support further studies to clarify the role of TLR7/TLR9 pathway and pDCs functioning as part of Recurrent Erythema Multiforme pathophysiology and potential future therapeutic target development.

**Keywords:** Dendritic cells. Erythema multiforme. Immunohistochemistry. Toll-like receptors. Interleukins. Immunity, innate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quadro clínico do eritema polimorfo: lesões em alvo típicas .....	27
Figura 2 - Quadro clínico do eritema polimorfo: topografia.....	28
Figura 3 - Quadro clínico do eritema polimorfo: acometimento oral .....	28
Figura 4 - Células dendríticas plasmocitoides (pDCs): conexão de relevância entre as imunidades inata e adaptativa.....	39
Figura 5 - Fluxograma do primeiro ciclo de tratamento oral para EPR.....	55
Figura 6 - Fluxograma do tratamento oral combinado do EPR .....	56
Figura 7 - Características clínicas do eritema polimorfo recorrente .....	62
Figura 8 - Expressão cutânea imuno-histoquímica de CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$ e MxA.....	68
Figura 9 - Vias TLR7/TLR9 nas pDCs (células dendríticas plasmocitoides) ativadas e regulação das respostas TLR nas pDCs.....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Doenças dermatológicas e células dendríticas plasmocitoides (pDCs) .....	46
Quadro 2 – Dados demográficos dos pacientes com EPR .....	63
Quadro 3 - Resumo dos resultados da comparação da expressão de CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$ e MxA na pele de doentes com EPR e nas peles de CS .....	69

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Características clínicas de 35 pacientes com EPR .....	53
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP	anatomopatológico
APRIL	ligante indutor de proliferação
BAFF	fator de ativação da célula B da família TNF
BCAP	adaptador de célula B
BDCA-2	antígeno de células dendríticas sanguíneas 2
BLNK	ligante de células B
C3	Complemento 3
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBC	carcinoma basocelular
CBM	cromoblastomicose
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD123	receptor da cadeia alfa da interleucina-3
CD303	antígeno de célula dendrítica do sangue 2 ( <i>blood derived dendritic cell antigen 2</i> )
cDC	célula dendrítica convencional
CS	controles saudáveis
DA	dermatite atópica
DAMPs	padrões moleculares associados a danos
DCIR	imunorreceptor de células dendríticas
DEVH	doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro

DM	dermatomiosite
DMC	densidade de cor
DNA	ácido desoxirribonucleico
EP	eritema polimorfo
EPL	erupção polimorfa à luz
EPP	eritema polimorfo persistente
EPR	eritema polimorfo recorrente
FcεRI	receptor de alta afinidade para a porção Fc de IgE
FcεRIα	receptor α de alta afinidade para a porção Fc de IgE
FCγRIIA	receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCMED	banco de exames laboratoriais informatizados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HD	hipótese diagnóstica
HE	hematoxilina-eosina
HLA	complexo de histocompatibilidade
HPV	papilomavírus humano
HSV	vírus do herpes simples
HVSK	herpes vírus associado ao sarcoma de Kaposi
ICOSL	ligante coestimulador induzível
IDO	indoleamina-2,3-dioxigenase

IFN	interferon
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
IL-6	interleucina 6
ILT7	transcrito semelhante à imunoglobulina 7
IOD	densidade ótica integrada
IRAK-4	cinase 4 associada ao receptor de interleucina 1
IRF7	fator regulador 7 de interferon
ITAM	motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina
ITIM	motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina
KC	queratoacantoma
LE	lúpus eritematoso cutâneo
LES	lúpus eritematoso sistêmico
LP	líquen plano
LS	líquen estriado
MAPks	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MHC	complexo de histocompatibilidade
Mx	proteína de resistência a myxovirus
MxA	proteína de resistência a myxovirus A
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88

NF- $\kappa$ B	fator nuclear kappa B
NK	<i>natural killer</i>
PAMPS	padrões moleculares associados a patógenos
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação em cadeia de polimerase
pDCs	células dendríticas plasmocitoides
PL	pitiríase liquenoide
PLC	pitiríase liquenoide crônica
PLEVA	pitiríase liquenoide e varioliforme aguda
PSO	psoríase
QA	queratose actínica
SK	sarcoma de Kaposi
TCD4+	linfócito T CD4
TCD8+	linfócito T CD8
TCR	receptores de células T
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformador beta
Th1	linfócito T <i>helper</i> 1
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TLR7	<i>Toll-like receptor 7</i>
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
TNF	fator de necrose tumoral

TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
Treg	T regulatória
UNC93B	homólogo B de UNC-93
varMxA	MxA variante
VV	verrugas vulgares
WHIM	verrugas, hipogamaglobulinemia, infecções e mielocatexia (síndrome)

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
n	Tamanho da amostra
+	Positivo
-	Negativo
mg	Miligrama
mm	Milímetro
UI	Unidade internacional
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{m}^2$	Micrômetro quadrado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>26</b>
2.1	ERITEMA POLIMORFO RECORRENTE .....	26
2.1.1	Histórico e epidemiologia.....	26
2.1.2	Aspectos clínicos do EPR.....	27
2.1.3	Aspectos diagnósticos do EPR .....	29
2.1.4	Etiopatogenia do EPR.....	30
2.1.5	Curso e tratamento do EPR .....	32
2.2	CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES .....	33
<b>3</b>	<b>PROPOSTAS DOS ESTUDOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>POPULAÇÃO ESTUDADA.....</b>	<b>36</b>
5.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	36
5.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	36
<b>6</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO 1.....</b>	<b>37</b>
6.1	INTRODUÇÃO.....	38
6.2	LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO (LE) .....	40
6.3	LÍQUEN PLANO (LP).....	40
6.4	LÍQUEN ESTRIADO (LS).....	41
6.5	DERMATITE ATÓPICA (DA).....	41
6.6	ERUPÇÃO POLIMORFA À LUZ (EPL).....	41
6.7	Psoríase (PSO).....	41
6.8	PITIRÍASE LIQUENOIDE (PL).....	42
6.9	DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO (DEVH) .....	43
6.10	VERRUGAS.....	43
6.11	DOENÇAS FÚNGICAS .....	43
6.12	HANSENÍASE.....	44
6.13	TUMORES CUTÂNEOS .....	44

6.14	CONCLUSÃO .....	45
<b>7</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO 2.....</b>	<b>50</b>
7.1	INTRODUÇÃO.....	51
7.2	MÉTODOS.....	51
7.3	RESULTADOS .....	52
7.4	DISCUSSÃO.....	56
<b>8</b>	<b>ARTIGO NO PRELO .....</b>	<b>59</b>
8.1	INTRODUÇÃO.....	60
8.2	OBJETIVO .....	61
8.3	MÉTODOS.....	61
8.3.1	Casuística.....	61
8.3.2	Imuno-histoquímica.....	65
8.3.3	Quantificação das células imunomarcadas .....	65
8.3.4	Análise estatística .....	66
8.4	RESULTADOS .....	66
8.4.1	Avaliação da presença das pDCs in situ.....	66
8.4.2	Análise da ativação das pDCs in situ através da via TLR7.....	66
8.4.3	Análise da ativação das pDCs in situ através da via TLR9.....	67
8.4.4	Análise in situ das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) .....	67
8.4.5	Análise in situ da produção de IFN tipo I.....	67
8.5	DISCUSSÃO.....	70
8.6	CONCLUSÃO.....	76
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>DISCUSSÃO FINAL.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O eritema polimorfo (EP) é uma dermatose caracterizada por lesões simetricamente distribuídas do tipo máculas, pápulas, bolhas e lesões em alvo, reconhecidas por uma porção central necrótica, enegrecida ou bolhosa, circundada por uma área vermelho-escura, com uma área externa com um anel mais claro e edematoso e uma zona eritematosa na periferia<sup>(1,2)</sup>.

Anteriormente o eritema polimorfo era considerado um espectro da síndrome de Stevens-Johnson/Necrólise epidérmica tóxica, mas atualmente é considerado uma entidade distinta<sup>(3)</sup>.

Eritema polimorfo recorrente (EPR) é caracterizado pela recorrência dos surtos ao longo do tempo, sendo que a maioria dos estudos demonstra uma média de seis episódios por ano, com duração média da doença de 6 a 10 anos<sup>(2,4)</sup>. A fisiopatologia da doença ainda não é completamente compreendida, mas estima-se que mais de 60% dos casos de EPR sejam causados por infecção pelo vírus do herpes simples<sup>(2,4-6)</sup>, e há evidências que o EPR seja um tipo de reação de hipersensibilidade tardia<sup>(7)</sup>.

As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) fazem parte da família das células dendríticas, detectam as infecções virais através do reconhecimento dos ácidos nucleicos virais e constituem importantes mediadoras da imunidade antiviral<sup>(8)</sup>.

Considerando-se que o interferon (IFN) tipo I derivado das pDCs não somente inibe diretamente a infecção viral, como também ativa as funções antivirais das células *natural killer* (NK), células dendríticas mieloides, linfócitos B e T, iniciando e orquestrando a imunidade antiviral inata e adaptativa<sup>(9)</sup>, alterações no recrutamento e/ou no funcionamento das pDCs podem elucidar a persistência da infecção herpética e a resposta inflamatória que resulta nas lesões clínicas de eritema polimorfo. Assim, torna-se relevante o estudo do perfil da expressão de citocinas que avaliem o perfil fenotípico e funcional das pDCs nos pacientes com EPR, para melhor compreensão da fisiopatologia e visando a alcançar alvos terapêuticos específicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ERITEMA POLIMORFO RECORRENTE

#### 2.1.1 Histórico e epidemiologia

O termo “eritema multiforme” foi descrito pela primeira vez por Ferdinand von Hebra em 1866, utilizado para descrever uma erupção dermatológica aguda, com acometimento cutâneo, autolimitada, com tendência à recorrência, mais comum em indivíduos jovens e do sexo masculino, com distribuição simétrica. As lesões iniciais descritas foram pápulas, que evoluíam para alterações de cores concêntricas (“eritema íris”) ou bolhas, com aumento e clareamento central. Os sintomas cutâneos descritos foram de queimação, prurido, com possibilidade de sintomas sistêmicos, como febre e calafrios, com resolução benigna, sem sequelas<sup>(10)</sup>.

A partir de 1880, pacientes com lesões semelhantes às descritas por von Hebra, porém com lesões mucosas, também foram diagnosticados como eritema multiforme<sup>(11,12)</sup>, ampliando o uso do termo.

Em 1922, Stevens e Johnson descreveram dois casos de doença febril aguda associada a lesões semelhantes ao eritema multiforme<sup>(13)</sup>. Com a consagração do epônimo “síndrome de Stevens-Johnson” ao longo dos anos, a doença ficou conhecida como uma variante grave e atípica de eritema multiforme<sup>(12)</sup>.

Em 1950, Bernard Thomas<sup>(14)</sup> publicou a classificação “eritema multiforme minor”, como uma referência à doença típica inicialmente descrita por von Hebra, enquanto “eritema multiforme major” seria sinônimo da Síndrome de Stevens-Johnson, forma mais grave com febre e acometimento mucoso.

Na década de 1990, Bastuji e Roujeau<sup>(15,16)</sup> diferenciaram eritema multiforme major e síndrome de Stevens Johnson, sugerindo que a doença eritema multiforme seria compatível com a descrição clássica de von Hebra, com alvos típicos ou “atípicos elevados” acrais ou

faciais, com ou sem acometimento mucoso. Já a síndrome de Stevens-Johnson seria entidade distinta, com alvos atípicos planos, bolhas sobre lesões purpúricas e descolamento da pele, com acometimento de mucosas, localizadas no tronco ou disseminadas.

No Brasil, os termos "eritema multiforme" e "eritema polimorfo" são sinônimos<sup>(17)</sup>.

A incidência do eritema polimorfo recorrente é estimada entre 0,01 e 1% da população, com acometimento predominante de adultos jovens, principalmente mulheres, sem predileção étnica<sup>(1,2,12)</sup>.

### 2.1.2 Aspectos clínicos do EPR

O eritema polimorfo é caracterizado por lesões simetricamente distribuídas do tipo máculas, pápulas, bolhas e lesões em alvo, reconhecidas por uma porção central necrótica, enegrecida ou bolhosa, circundada por uma área vermelho-escura, com uma área externa com um anel mais claro e edematoso e uma zona eritematosa na periferia, como mostra a figura 1. Também pode haver lesões atípicas, arredondadas, edematosas, com apenas dois anéis concêntricos ou com bordas mal definidas<sup>(1,2)</sup>.

Figura 1 - Quadro clínico do eritema polimorfo: lesões em alvo típicas

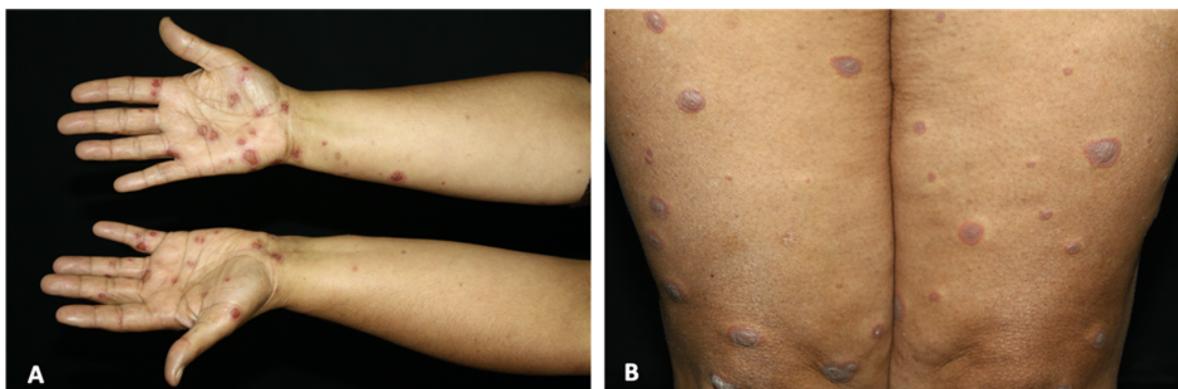


Legenda: Detalhe das lesões em alvo típicas, com três zonas concêntricas.

Fonte: Acervo do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, 2023.

As lesões distribuem-se simetricamente, preferencialmente nas extremidades e nas superfícies extensoras, menos frequentemente no tronco, e pode haver fenômeno isomórfico, conforme demonstrado na figura 2. Acometimento mucoso é frequente, em 25-60% dos casos, principalmente oral (70%), como detalhado na figura 3, mas também genital e de nasofaringe, com enantema, vesículas e erosões. O acometimento ocular pode apresentar ceratite, cicatrizes conjuntivais, uveíte e até mesmo amaurose. Outras complicações do acometimento mucoso são esofagite, estenose esofágica e pneumonia. Sintomas como prurido, dor, ardor são frequentes. Em alguns casos, há sintomas prodrômicos, como fraqueza, febre e mialgia, principalmente nos casos de EP com lesões orais <sup>(1,2)</sup>.

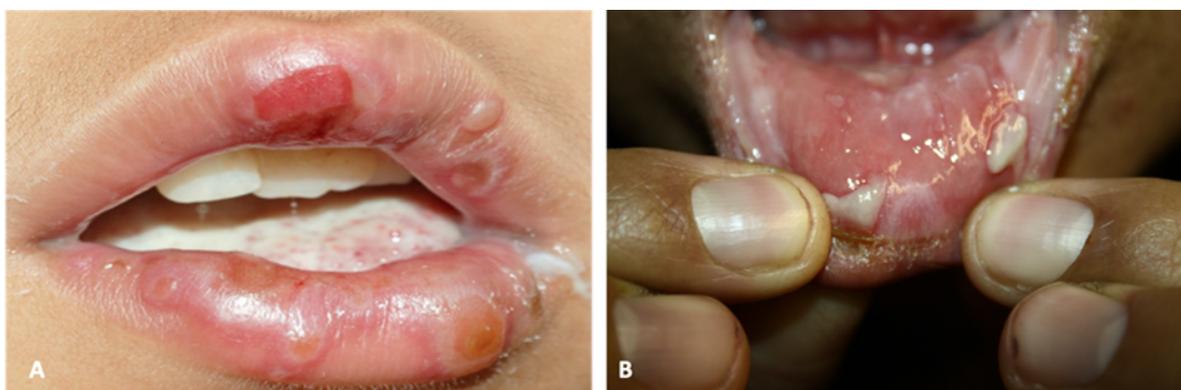
Figura 2 - Quadro clínico do eritema polimorfo: topografia



Legenda: Lesões em alvo simetricamente distribuídas nas extremidades (A) e nas superfícies extensoras (B).

Fonte: Acervo do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, 2023.

Figura 3 - Quadro clínico do eritema polimorfo: acometimento oral



Legenda: Acometimento da mucosa oral, com bolhas, erosões e lesões em alvo (A), enantema e bolhas (B).

Fonte: Acervo do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, 2023.

Em geral, o eritema polimorfo apresenta surto único, com resolução em até 1-2 semanas, habitualmente sem a formação de cicatrizes. Eritema polimorfo recorrente (EPR) é caracterizado pela recorrência dos surtos ao longo do tempo; a maioria dos estudos demonstra uma média de seis episódios por ano, com duração média da doença de 6 a 10 anos<sup>(2,4)</sup>. Já o eritema polimorfo persistente (EPP) é raro e caracterizado pelo aparecimento contínuo de lesões de EP<sup>(1,2,18)</sup>.

### **2.1.3 Aspectos diagnósticos do EPR**

O diagnóstico de EPR é fundamentalmente clínico<sup>(19)</sup>. A investigação complementar pode ser feita com exame histopatológico e a investigação etiológica através de história e exames clínicos, sorologias virais e exame citológico e/ou PCR (reação em cadeia de polimerase) de conteúdo de vesícula, no caso lesões clínicas sugestivas de herpes simples.

#### **2.1.3.1 Histopatologia do EPR**

Ao exame anatomopatológico (AP) observa-se exocitose de linfócitos, necrose de queratinócitos e degeneração vacuolar da camada basal. Pode haver clivagem subepidérmica e infiltrado linfo-histiocitário superficial e médio, perivascular e eventualmente liquenoide. As alterações dérmicas, como edema papilar, vasodilatação, infiltrado mononuclear perivascular, são mais proeminentes nas lesões papulosas iniciais. Já as alterações epidérmicas, como necrose, são mais encontradas nos casos evolutivos, principalmente no centro das lesões em alvo<sup>(1)</sup>.

### 2.1.3.2 Aspectos imunológicos

A imunofluorescência direta é inespecífica, com os achados de depósito de C3 (complemento 3) granular e de IgM (imunoglobulina M) na junção dermoepidérmica e na parede dos vasos superficiais, além de corpos citoides<sup>(1)</sup>.

### 2.1.3.3 Critérios diagnósticos

Schofield, Tatnall e Leigh<sup>(4)</sup> estabeleceram em 1993 os critérios para diagnóstico de EPR: presença de uma erupção fixa, simetricamente distribuída, incluindo lesões em alvo, com ou sem acometimento mucoso, ocorrendo em pelo menos três ocasiões.

Wetter e Davis<sup>(2)</sup> descreveram o termo “eritema multiforme mucoso recorrente”, caracterizado pela presença de lesões orais na ausência de lesões cutâneas, com envolvimento de lesões orais e labiais, assim como previamente descrito por Rogers<sup>(20)</sup>, com áreas difusas de eritema mucoso, vesículas, bolhas e erosões, ulceração afetando tanto as áreas não-queratinizadas quanto queratinizadas dos lábios, ou placas queratósicas inespecíficas entremeadas a eritema.

## 2.1.4 Etiopatogenia do EPR

Na literatura há diversos fatores causais descritos, tais como infecções, medicações, malignidades, doenças autoimunes, radiação, imunização e menstruação. Dentre esses fatores, as infecções representam 90% dos casos, e o agente mais comum é o vírus do herpes simples (HSV). Estima-se que mais de 60% dos casos de EPR sejam causados por infecção por HSV, sendo outras causas: infecção por *Mycoplasma pneumoniae*, infecção pelo vírus da hepatite C, candidose vulvovaginal e menstruação<sup>(1,2)</sup>.

Frequentemente não se encontra uma associação clínica e laboratorial bem estabelecida com o HSV, porém acredita-se que infecções subclínicas por HSV representem a causa em muitos casos considerados idiopáticos, uma vez que foi demonstrada positividade entre 50-60% para o DNA (ácido desoxirribonucleico) do vírus do herpes simples através de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em fragmentos de pele obtidos por meio de biópsias das lesões cutâneas de pacientes com EPR idiopático. Diversos estudos realizaram PCR para HSV, positivo nos queratinócitos basais das biópsias de pele de lesões compatíveis com eritema polimorfo, sendo que a DNA polimerase foi o fragmento de DNA mais frequentemente detectado nos tecidos com EP, detectado em 70% dos casos. Na pele cicatrizada encontrou-se DNA polimerase positiva por técnica de PCR após 1-3 meses. Além disso, a resposta clínica ao tratamento com drogas antivirais nos casos de EPR corrobora essa etiologia<sup>(21-25)</sup>.

Contudo, a maioria dos pacientes com herpes simples não apresenta eritema polimorfo. Alguns estudos apontaram alguns alelos HLA (complexo de histocompatibilidade) (como B15, B35, A33, DQW3, DQB\*0302, DRw53, DQW3, DR53) de maior propensão ao desenvolvimento de EP. Também há a associação do HLA DQB1\*0302 em paciente com EP de acometimento mucoso leve e do HLA DQB1\*0402 em pacientes com acometimento mucoso grave<sup>(5,26-28)</sup>.

Em relação ao EP relacionado à infecção herpética, sabe-se que, após a infecção, os fragmentos de DNA viral são fagocitados por células mononucleares do sangue periférico, como macrófagos e células CD34+ (*cluster of differentiation* 34) progenitoras das células de Langerhans. Assim, o DNA viral é transportado até a epiderme. Genes de DNA polimerase do HSV, contidos em fragmentos de DNA depositados na pele são expressos, levando ao recrutamento de linfócitos Th1 CD4+ específicos, que respondem aos antígenos com a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Isso leva ao sequestro de leucócitos, monócitos e células NK. Os macrófagos e células de Langerhans CD34+ que fagocitam o DNA do HSV, a habilidade de processá-lo, as proteínas virais expressas na pele e a presença de epítomos comuns às proteínas celulares determinam se um episódio de herpes simples será seguido de eritema polimorfo <sup>(29)</sup>. Ono et al. <sup>(30)</sup> verificaram aumento das células CD34 circulantes nos pacientes com EPR no momento das lesões cutâneas de eritema polimorfo, enquanto esse aumento não foi verificado nos pacientes apenas com lesões de herpes simples, sugerindo que

o transporte do DNA do vírus do herpes simples pelas células CD34 pode estar envolvido na fisiopatologia do EPR.

O repertório de receptores de células T (TCR) utilizados pelos linfócitos T nas reações de hipersensibilidade tardias é restrito. Estudos demonstraram correlação entre a duração das lesões de EP e o tipo de TCR utilizado ( $V\beta 2$ ), indicando que a resposta específica de linfócitos T está envolvida na patogênese do eritema polimorfo <sup>(7)</sup>.

### **2.1.5 Curso e tratamento do EPR**

O EPR apresenta curso prolongado; a maioria dos estudos demonstra uma média de seis episódios por ano, com duração média da doença de 6 a 10 anos<sup>(2,4)</sup>.

O tratamento atual é baseado no uso de antivirais (aciclovir, valaciclovir, famciclovir, penciclovir) em cursos contínuos de 6 meses. Porém, em alguns casos o tratamento com antivirais não é suficiente para atingir o controle da doença<sup>(2,6,19,31)</sup>.

O uso de corticosteroides para tratamento de EPR é comum, porém recidivas são frequentes com a suspensão e os efeitos adversos com o uso a longo prazo são relevantes<sup>(2,31,32)</sup>.

Assim, o uso de drogas de ação imunomoduladora, como dapsona, talidomida e hidroxiclороquina pode ser combinado ao tratamento antiviral para melhor controle do EPR<sup>(1,2,32)</sup>. Em casos graves e refratários, o uso de imunossupressores, como azatioprina e micofenolato de mofetila, pode ser necessário<sup>(1,2)</sup>.

Outras opções terapêuticas têm sido descritas para tratamento de EPR, como levamisol<sup>(33)</sup>, lenalidomida<sup>(34)</sup>, apremilast<sup>(35)</sup>, adalimumab<sup>(36)</sup> e interferon<sup>(37)</sup>, mas são necessários estudos adicionais para comprovação da segurança e eficácia dessas drogas em casos resistentes.

## 2.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES

As pDCs fazem parte da família das células dendríticas, desenvolvendo-se a partir das células tronco hematopoiéticas da medula. Foram descritas inicialmente por Lennert e Remmele em 1958, então denominadas linfoblastos e detectadas na região paracortical de linfonodos reativos<sup>(38)</sup>. A partir do final dos anos 80 as pDCs foram estudadas por outros autores<sup>(39,40)</sup>, sendo também chamadas de células T plasmocitoides e monócitos plasmocitoides<sup>(41,42)</sup>.

As pDCs exibem CD123 (receptor da cadeia alfa da interleucina-3) e BDCA-2 (antígeno de células dendríticas sanguíneas 2) e são mediadoras importantes da imunidade inata, sendo as mais potentes produtoras de IFN (interferon) tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ )<sup>(8)</sup>.

A ativação das pDCs ocorre através dos *Toll-like receptors* (TLR) 7 e 9, gerando uma sinalização que induz a expressão de múltiplos genes codificadores de moléculas imunomoduladoras e pró-inflamatórias, tais como IFN- $\alpha$ . Desse modo, as pDCs detectam as infecções virais através do reconhecimento dos ácidos nucleicos virais, sendo relevantes promotoras da imunidade antiviral<sup>(8)</sup>.

### 3 PROPOSTAS DOS ESTUDOS

Os estudos que serão descritos decorrem de um projeto do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) de 2015 a 2023. A revisão sobre células dendríticas plasmocitoides teve como objetivo entender e sintetizar o papel que essas células exercem nas doenças dermatológicas. O seguimento dos pacientes teve o propósito de melhorar o atendimento ambulatorial, através da avaliação do perfil demográfico e da análise dos dados laboratoriais dos pacientes com EPR, além de propor um protocolo de tratamento, visando estabelecer o melhor controle do eritema polimorfo recorrente com maior segurança e eficácia. Por fim, avaliamos a presença e a atividade das células dendríticas plasmocitoides na inflamação e na imunidade inata em pacientes com eritema polimorfo recorrente em comparação com controles saudáveis (CS), através da expressão de CD123 (receptor da cadeia alfa da interleucina-3), TLR7 (*Toll-like receptor 7*), TLR9 (*Toll-like receptor 9*), IL-6 (interleucina 6), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e MxA (proteína de resistência a myxovirus A), a fim de avançar na compreensão da fisiopatologia do EPR.

#### **4 ASPECTOS ÉTICOS**

Para a realização das análises experimentais dos pacientes EPR, foi obtida a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – CAAE: 66313817.0.0000.0068, parecer número: 2.204.778), em anexo (Anexo A). Adicionalmente, obtivemos a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) de todos os pacientes envolvidos, após esclarecimento sobre as intervenções propostas nos estudos e possíveis riscos.

Por se tratar de análise em material humano previamente armazenado, foi mantido sigilo dos doentes, de acordo com a declaração de confidencialidade aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP.

## 5 POPULAÇÃO ESTUDADA

### 5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes com o diagnóstico de eritema polimorfo recorrente, atendidos no Ambulatório Especializado de Dermatoses Bolhosas Autoimunes e no Ambulatório de Eritema Polimorfo do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, coordenados pelas Dras. Claudia G. Santi e Denise Miyamoto, com o diagnóstico confirmado através do exame clínico e de histopatológico.

Para análise clínica, histológica e imuno-histoquímica, os doentes foram selecionados através de revisão de prontuários de todos os indivíduos com diagnóstico de eritema polimorfo durante seu acompanhamento nos ambulatórios descritos, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2015. Posteriormente, adicionamos pacientes em seguimento até dezembro de 2019 para análise do perfil demográfico e terapêutico.

O grupo controle foi selecionado a partir de fragmentos de pele de indivíduos saudáveis (CS) previamente armazenados no Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP, obtidos a partir de pele excedente em pacientes submetidos à mamoplastia redutora, blefaroplastia e abdominoplastia.

### 5.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os doentes: menores de 18 anos, grávidas, casos que não apresentaram confirmação do diagnóstico de EPR nos registros dos prontuários médicos, pacientes que perderam seguimento antes do início do estudo e aqueles que não possuíam fragmentos de pele armazenados ou sorologia para o vírus do herpes simples (IgG e IgM) previamente documentada no banco de exames laboratoriais informatizados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCMED).

## 6 ARTIGO PUBLICADO 1

Dias de Oliveira NF, Santi CG, Maruta CW, Aoki V. Plasmacytoid dendritic cells in dermatology. *An Bras Dermatol.* 2021;96(1):76-81. doi: 10.1016/j.abd.2020.08.006.



[An Bras Dermatol.](#) 2021 Jan-Feb; 96(1): 76–81.

PMCID: PMC7838105

Published online 2020 Nov 21. doi: [10.1016/j.abd.2020.08.006](https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.08.006)

PMID: [33342561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33342561/)

## Plasmacytoid dendritic cells in dermatology<sup>☆☆☆</sup>

[Natasha Favoretto Dias de Oliveira](#),\* [Claudia Giuli Santi](#), [Celina Wakisaka Maruta](#), and [Valeria Aoki](#)

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [PMC Disclaimer](#)

### Abstract

[Go to: ►](#)

Plasmacytoid dendritic cells are part of the dendritic cells family and are a relevant link between innate and adaptive immunity. They are the most potent producers of type 1 interferon, generating antiviral response, stimulating macrophages and dendritic cells and inducing activation and migration of natural killer cells. Plasmacytoid dendritic cells also exert a role as antigen-presenting cells, promote T-lymphocyte responses, immunoregulation, plasma cells differentiation and antibody secretion. Even though plasmacytoid dendritic cells are not usually present in normal skin, their presence is detected in healing processes, viral infections, and inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases. In recent years, the presence of plasmacytoid dendritic cells in several dermatological diseases has been described, enhancing their potential role in the pathogenesis of such conditions. Future studies on the role of plasmacytoid dendritic cells in dermatology may lead to new therapeutic targets.

**Keywords:** Adaptive immunity, Dendritic cells, Dermatological diseases, Dermatology, Innate immunity

## 6.1 INTRODUÇÃO

As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) fazem parte da família das células dendríticas e se desenvolvem das células tronco hematopoiéticas da medula. Lennert e Remmele fizeram a primeira menção a esse então novo tipo celular em 1958, denominado linfoblasto e detectado na região paracortical de linfonodos reativos<sup>(38)</sup>. A partir do final dos anos 80, as pDCs receberam diversas denominações ao longo do tempo (células T plasmocitoides, monócitos plasmocitoides)<sup>(39-42)</sup>.

Caracteristicamente, as pDCs exibem CD123 (receptor da cadeia alfa da interleucina-3) e BDCA-2 (*blood derived dendritic cell antigen 2* ou CD303) e são mediadoras chave da imunidade inata, sendo as mais potentes produtoras de IFN tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , IFN- $\omega$  e IFN- $\tau$ ), secretando mil vezes mais IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  que outros tipos celulares<sup>(8)</sup>.

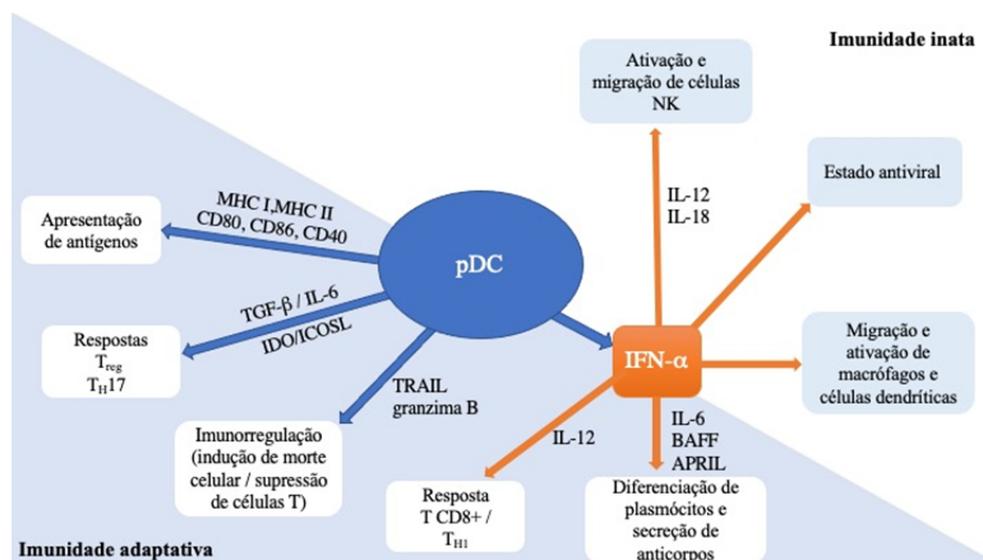
Sua ativação ocorre através dos *Toll-like receptors* (TLR) 7 e 9, gerando uma sinalização que induz a expressão de múltiplos genes codificadores de moléculas imunomoduladoras e pró-inflamatórias, tais como IFN- $\alpha$ . O TLR7 responde ao RNA de fita simples (rico em guanosina ou uridina) encontrado nos vírus (influenza, vírus sincicial respiratório), enquanto o TLR9 detecta moléculas de DNA contendo sítios CpG não metilados comumente encontrados no genoma de vírus, como HSV. Assim, as pDCs detectam as infecções virais através do reconhecimento dos ácidos nucleicos virais e constituem importantes mediadoras da imunidade antiviral<sup>(8)</sup>.

As pDCs são uma conexão importante entre as imunidades inata e adaptativa (figura 4). Estas células produzem IFN tipo I em resposta às infecções virais, promovendo um estado antiviral através da expressão de genes estimulados por IFN e da apoptose de células infectadas. Em conjunto com IFN, as interleucinas (IL)-12 e IL-18 ativam as células NK, gerando a secreção de IFN- $\gamma$  e a lise de células alvo. A produção de IFN pelas pDCs também leva ao estímulo de macrófagos e células dendríticas. Através da expressão de complexos de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), as pDCs promovem a imunidade adaptativa, atuando como células apresentadoras de antígeno tanto para linfócitos T CD4+ quanto CD8+. A expressão de IDO (indoleamina-2,3-dioxigenase) e ICOSL (ligante coestimulador induzível) geram resposta T regulatória (Treg) enquanto a produção de TGF- $\beta$  e IL-6 pelas pDCs leva à resposta T *helper* (Th) 17. Através da produção

de IFN-I e IL-12 pelas pDCs há o estímulo da atividade TCD8<sup>+</sup> e a polarização das células TCD4<sup>+</sup> para Th1. A produção de IFN-I, IL-6, BAFF (fator de ativação da célula B da família TNF) e APRIL (ligante indutor de proliferação) pelas pDCs causa a expansão e a estimulação de plasmócitos produtores de anticorpos. TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF) e granzima B conferem às pDCs a capacidade de eliminar células tumorais, induzir apoptose de células TCD4<sup>+</sup> infectadas e suprimir a proliferação de células T. Além disso, as próprias pDCs estimulam a diferenciação de células plasmocitoides através de IFNs tipo I e IL-6<sup>(8,43-46)</sup>.

pDCs não estão presentes habitualmente na pele normal; elas infiltram a pele nos processos de cicatrização e em diversas doenças, como infecções virais, doenças inflamatórias, doenças autoimunes e neoplásicas<sup>(39,40)</sup>. Revisão da literatura sobre a presença de pDCs e doenças dermatológicas será descrita a seguir.

Figura 4 - Células dendríticas plasmocitoides (pDCs): conexão de relevância entre as imunidades inata e adaptativa



Legenda: APRIL: ligante indutor de proliferação; BAFF: fator de ativação da célula B da família fator de necrose tumoral alfa; CD: *cluster of differentiation*; ICOSL: ligante coestimulador induzível; IDO: indoleamina-2,3-dioxigenase; IFN- $\alpha$ : interferon alfa; IL: interleucina; MHC: complexo de histocompatibilidade; NK: *natural killer*; pDC: célula dendrítica plasmocitoide; TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta; TH: linfócito T-helper; TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral alfa; Treg: linfócito T-regulatório.

Fonte: Adaptado de Mitchell, Chintala e Dey<sup>(45)</sup> e Swiecki e Colonna<sup>(46)</sup>.

## 6.2 LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO (LE)

No lúpus eritematoso, as pDCs são as principais produtoras de IFN- $\alpha$ . Sabe-se que as pDCs circulantes estão reduzidas nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), uma vez que elas migram e infiltram os tecidos-alvo, como a pele. Diversos estudos demonstraram grandes quantidades de pDCs produtoras de IFN- $\alpha$  nas lesões de lúpus crônico discoide<sup>(47-49)</sup>.

Tomasini et al.<sup>(40)</sup> encontraram diferenças na distribuição das pDCs nos diferentes tipos de lúpus: distribuição superficial nos casos de lúpus subagudo e lúpus discoide, e distribuição ao redor de vasos profundos nos casos de lúpus tímido e retículo-histiocitose multicêntrica. Também verificaram relação positiva entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a quantidade de pDCs.

Adicionalmente, o número de pDCs nas lesões de lúpus (LE) e dermatomiosite (DM) correlacionou-se com a expressão de proteína de resistência a myxovirus (Mx) A, proteína induzida por IFN- $\alpha/\beta$ , sugerindo que as pDCs são fonte importante de IFN- $\alpha$  nessas doenças<sup>(47,50,51)</sup>. McNiff et al. verificaram que as pDCs foram preferencialmente detectadas na epiderme nos pacientes com dermatomiosite quando comparados aos pacientes com lúpus, nos quais a localização foi principalmente na derme, sugerindo que no LE os complexos de autoanticorpos circulantes migram através dos vasos antes de se depositarem na pele<sup>(47)</sup>.

## 6.3 LÍQUEN PLANO (LP)

De Vries et al. observaram pDCs CD123+ abundantes nos fragmentos de pele de líquen plano, dispostas no infiltrado linfocitário em faixa na junção dermo-epidérmica. Além disso, posteriormente demonstraram a replicação de herpes vírus 7 nas células dendríticas plasmocitoides nas lesões de LP ativo, com diminuição após a remissão da doença<sup>(52,53)</sup>.

Wang et al.<sup>(54)</sup> descreveram o aumento da infiltração de células dendríticas plasmocitoides no líquen plano oral, propondo que elas seriam as mediadoras da resposta imune inata nessa doença.

#### 6.4 LÍQUEN ESTRIADO (LS)

Badr et al. encontraram pDCs no infiltrado inflamatório do líquen estriado, sugerindo que elas possam apresentar um papel na patogênese da doença. Adicionalmente, descreveram a distribuição periécrina das pDCs no LS, a qual poderia ser um critério histológico útil para diferenciação entre LS e LP<sup>(55)</sup>.

#### 6.5 DERMATITE ATÓPICA (DA)

Nos pacientes com dermatite atópica houve um aumento das pDCs circulantes; além disso, o recrutamento de pDCs nas lesões de DA foi muito menor do que o encontrado em outras dermatoses, como LE e psoríase. Esse fraco recrutamento de pDCs, resultando na baixa produção de IFN tipo I nas lesões de DA, poderia explicar a maior suscetibilidade dos pacientes com DA a infecções virais, como infecções por HSV e poxvirus<sup>(56,57)</sup>.

#### 6.6 ERUPÇÃO POLIMORFA À LUZ (EPL)

Rossi et al., em contraposição a estudos anteriores, demonstraram aumento estatisticamente significativo de pDCs nos pacientes com EPL, em comparação aos controles saudáveis, provavelmente pelo teste fotoprovocativo realizado<sup>(58, 59)</sup>.

#### 6.7 PSORÍASE (PSO)

Nestle et al. <sup>(60)</sup> encontraram grandes quantidades de pDCs no infiltrado de linfócitos T presente na derme das placas psoriáticas, ausentes na pele de controles sadios e de pacientes com DA. Adicionalmente, as pDCs também foram encontradas na pele adjacente,

mesmo sem lesões aparentes. Os autores também verificaram<sup>(60)</sup> a redução das pDCs no sangue periférico dos pacientes com psoríase quando comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo que o acúmulo de pDCs na pele dos pacientes com psoríase ocorre devido a redistribuição das pDCs do sangue para a pele. Em modelo animal, os autores demonstraram a produção de IFN- $\alpha$  pelas pDCs na pele lesada e a sua influência para a ativação dos linfócitos T, levando ao desenvolvimento das lesões de psoríase<sup>(60)</sup>.

Outro estudo sobre psoríase demonstrou que a helioterapia promoveu não somente melhora clínica, mas também redução do número de pDCs e da expressão de MxA - marcador para IFN- $\alpha$  - na pele lesional, fortalecendo o papel das pDCs na psoríase<sup>(61)</sup>.

A quemerina é um fator quimiotático para pDCs séricas. Albanesi et al.<sup>(62)</sup> demonstraram forte expressão de quemerina na derme de pele adjacente às lesões psoriáticas. Houve baixa expressão de quemerina e poucas pDCs nas placas de psoríase crônica, sugerindo que a expressão de quemerina ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento das lesões de psoríase e se correlaciona temporalmente com a presença das pDCs.

## 6.8 PITIRÍASE LIQUENOIDE (PL)

A fisiopatologia da pitiríase liquenoide (PL) não é totalmente compreendida. A demonstração da expressão de MxA nas lesões de PL estabelece a produção local de IFN tipo I<sup>(63,64)</sup>.

Karouni et al.<sup>(65)</sup> demonstraram a presença de pDCs na pele de pacientes com PL nas duas formas, pitiríase liquenoide e varioliforme aguda (PLEVA) e pitiríase liquenoide crônica (PLC). Além disso, encontraram expressão intensa e difusa de MxA, demonstrando sua ativação e produção de IFN tipo I. Os autores<sup>(65)</sup> sugeriram que infecções virais, autoantígenos, trauma, antígenos contra drogas e tumores – previamente associados aos casos de PL – poderiam contribuir para o recrutamento e ativação das pDCs, cuja presença também foi demonstrada em outras dermatites de interface, como líquen plano, líquen estriado, lúpen e dermatomiosite.

## 6.9 DOENÇA DO ENXERTO *VERSUS* HOSPEDEIRO (DEVH)

Malard et al.<sup>(66)</sup> identificaram a presença de pDCs em fragmentos de pele de pacientes com DEVH aguda, assim como uma forte expressão de MxA, sinalizando a produção local de IFN tipo I. Previamente, o mesmo grupo<sup>(67)</sup> relatou a redução sérica dos níveis de pDCs nos pacientes com DEVH aguda, e os autores<sup>(66)</sup> sugeriram que essa redução retrata a infiltração das pDCs nos tecidos-alvo da DEVH. Contudo, a presença de células CD123+ na mucosa oral de pacientes com DEVH crônica não foi superior aos controles no estudo realizado por Botari et al.<sup>(68)</sup>, o que poderia sugerir uma participação das pDCs apenas nos estágios iniciais da DEVH.

## 6.10 VERRUGAS

A demonstração da presença de pDCs ativadas nas verrugas virais inflamadas foi baseada na expressão intensa de MxA<sup>(69)</sup>, ao contrário dos dados de Tomasini et al.<sup>(40)</sup>. Os resultados opostos podem estar relacionados aos diferentes critérios histológicos de verruga inflamada utilizados pelos dois grupos<sup>(69)</sup>.

Tassone et al.<sup>(70)</sup> avaliaram pacientes com síndrome WHIM (verrugas, hipogamaglobulinemia, infecções e mielocatexia), que apresentam verrugas refratárias; os autores apontaram redução das pDCs no sangue periférico e nas lesões cutâneas, bem como ausência da produção de IFN tipo I - avaliada através da expressão de MxA - sugerindo a incapacidade de atividade antiviral das pDCs via TLR9.

## 6.11 DOENÇAS FÚNGICAS

Pagliari et al.<sup>(71)</sup> avaliaram o papel das pDCs em três micoses profundas (cromoblastomicose, lacaziose e paracoccidioidomicose). pDCs foram encontradas em 37%

dos fragmentos de pele dos pacientes com cromoblastomicose (CBM) e em 50% dos espécimes de pacientes com paracoccidoidomicose (PCM), porém ausentes nos pacientes com lacaziose. Os autores sugeriram a hipótese de que as pDCs seriam fonte secundária de citocinas relevantes na atividade antifúngica nos casos de CBM e PCM. No caso da lacaziose, a ausência de pDCs poderia significar que essas células não atuam na resposta imune antifúngica.

## 6.12 HANSENÍASE

Massone et al.<sup>(44)</sup> descreveram a ausência de expressão de CD123 nos fragmentos de pele de pacientes com hanseníase, exceto pela expressão focal em dois casos de eritema nodoso hansênico, inferindo que as pDCs não estariam envolvidas na resposta imunológica contra o *Mycobacterium leprae*. Hirai et al.<sup>(72)</sup>, contudo, encontraram pDCs no infiltrado inflamatório e também ao redor dos vasos na pele de pacientes com hanseníase, sendo que o número de pDCs nos casos tuberculóides foi significativamente maior em comparação com os casos virchowianos.

## 6.13 TUMORES CUTÂNEOS

A presença das pDCs nos tumores cutâneos foi analisada por diversos autores. Abbas et al.<sup>(73)</sup> identificaram em seu estudo a presença de pDCs em 100% dos casos de queratoacantoma (KC) e 90% dos casos de carcinoma espinocelular. No queratoacantoma as pDCs foram mais abundantes, representando uma maior proporção do infiltrado inflamatório, e apresentaram maior atividade, sugerindo um possível papel das pDCs na patogênese da regressão dos queratoacantomas. Recentemente, Fraga et al.<sup>(74)</sup> corroboraram a presença abundante de pDCs tanto no queratoacantoma quanto no carcinoma espinocelular, sem diferença estatisticamente significativa.

Imiquimode é um agonista seletivo do TLR7, atuando via ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e produção de citocinas inflamatórias, como IFN tipo I, e é utilizado no tratamento de alguns tumores cutâneos<sup>(75)</sup>. Carcinomas basocelulares (CBCs) tratados com imiquimode apresentaram pDCs ativadas produtoras de IFN- $\alpha$  no infiltrado peritumoral<sup>(76)</sup>. Posteriormente, Ogawa et al.<sup>(75)</sup> demonstraram a correlação entre o número de pDCs recrutadas nas lesões de queratoses actínicas (QA) e efeito terapêutico do imiquimode nesses casos.

A presença das pDCs também foi descrita no melanoma, principalmente localizadas ao redor dos vasos e próximas às células tumorais, tanto nos casos primários quanto nas metástases. Porém, essas pDCs não estão ativadas, há falta de sinalização TLR7 e TLR9 no ambiente tumoral e não há a produção de IFN tipo I, e elas foram associadas ao crescimento tumoral. Ao contrário, melanomas em regressão apresentam pDCs ativadas, indicando possível atividade antitumoral. O tratamento de tumores cutâneos (queratoses actínicas, carcinomas basocelulares superficiais, doença de Bowen e lentigo maligno) com imiquimode (agonista de TLR7) ativa as pDCs a produzirem IFN tipo I<sup>(77)</sup>.

Analogamente, Karouni, Kurban e Abbas<sup>(78)</sup> descreveram que, no Sarcoma de Kaposi (SK), as pDCs estão presentes em 90% dos casos, porém com expressão diminuída de MxA, podendo indicar supressão pelo herpes vírus associado ao sarcoma de Kaposi (HVSK), através de proteínas virais que inibiriam as vias de sinalização responsáveis pela ativação das pDCs.

Os principais achados das pDCs nas doenças dermatológicas estão resumidos no quadro 1.

## 6.14 CONCLUSÃO

Sabe-se atualmente que as pDCs são o elo entre as imunidades inata e adaptativa. Essas células não são residentes na pele, portanto sua presença pode indicar seu papel (tanto central quanto adjuvante) nos processos inflamatórios, autoimunes, neoplásicos e infecciosos. São necessários mais estudos sobre as pDCs, que poderão levar a novos alvos terapêuticos.

Quadro 1- Doenças dermatológicas e células dendríticas plasmocitoides (pDCs)

<b>Doenças dermatológicas</b>	<b>pDCs</b>
Lúpus eritematoso	<p>-LES: pDCs circulantes reduzidas<sup>(40, 47-49)</sup></p> <p>-LD: grande quantidade de pDCs produtoras de IFN-<math>\alpha</math><sup>(40,47-49)</sup></p> <p>-LSA, LD: distribuição superficial<sup>(40)</sup></p> <p>-LT, RHM: distribuição ao redor dos vasos profundos<sup>(40)</sup></p> <p>-pDCs localizadas preferencialmente na epiderme nos pacientes com DM e na derme nos casos de lúpus<sup>(47)</sup></p>
Líquen plano	<p>-pDCs dispostas similarmente ao infiltrado linfocitário em faixa na junção dermoepidérmica<sup>(52,53)</sup></p> <p>-pDCs aumentadas no líquen plano oral<sup>(54)</sup></p>
Líquen estriado	<p>-pDCs presentes no infiltrado inflamatório</p> <p>-distribuição peri-écrina das pDCs<sup>(55)</sup></p>
Dermatite atópica	<p>-pDCs circulantes aumentadas em relação aos controles</p> <p>-menor recrutamento de pDCs nas lesões de DA comparado ao de outras dermatoses, como lúpus eritematoso e psoríase<sup>(56,57)</sup></p>
Erupção polimorfa à luz	<p>-Wackernagel et al.<sup>(58)</sup>: pDCs ausentes</p> <p>-Rossi et al.<sup>(59)</sup>: pDCs aumentadas nas lesões de EPL, principalmente na derme. Os autores atribuem a diferença à metodologia com inclusão de teste fotoprovocativo.</p>

Continua

Continuação	
<b>Doenças dermatológicas</b>	pDCs
Psoríase	<p>-pDCs presentes no infiltrado linfocitário T na derme das placas de psoríase e na pele perilesional<sup>(60)</sup></p> <p>-redução das pDCs no sangue periférico de pacientes com psoríase<sup>(60)</sup></p> <p>-helioterapia: redução do número de pDCs e da expressão de MxA<sup>(61)</sup></p> <p>-forte expressão de quemerina e presença de pDCs na derme da pele perilesional<sup>(62)</sup></p>
Pitiríase liquenoide	<p>-forte expressão de MxA nas lesões de PL (produção local de IFN tipo I)<sup>(63,64)</sup></p> <p>- presença de pDCs na pele em todos os casos (PLEVA e PLC)<sup>(65)</sup></p>
Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro	<p>-presença de pDCs nos fragmentos de pele dos pacientes com DEVH aguda, forte expressão de MxA, sinalizando produção local de IFN tipo I<sup>(66)</sup></p> <p>-redução de pDCs séricas nos pacientes com DEVH aguda<sup>(67)</sup></p> <p>-presença de células CD123 + na mucosa oral de pacientes com DEVH crônica não foi superior<sup>(68)</sup></p>
Verrugas	<p>-Saadeh et al.<sup>(69)</sup>: pDCs ativadas nas verrugas virais inflamadas, ao contrário do encontrado por Tomasini et al. <sup>(40)</sup> (possível diferença no critério histológico para verruga inflamada).</p>

Continua

Continuação	
Doenças dermatológicas	pDCs
	- redução das pDCs no sangue periférico e nas lesões cutâneas, ausência de produção de IFN tipo I (MxA sem expressão) em pacientes com síndrome WHIM <sup>(70)</sup>
Micoses profundas	- pDCs encontradas em 37% dos fragmentos de pele em pacientes com cromoblastomicose (CBM) e em 50% dos espécimes de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM), porém ausentes nos casos de lacaziose <sup>(71)</sup>
Hanseníase	- Massone et al <sup>(44)</sup> : ausência de expressão de CD123, exceto expressão focal em 2 casos de eritema nodoso hansênico  - Hirai et al <sup>(72)</sup> : pDCs no infiltrado inflamatório e ao redor dos vasos. Número de pDCs maior nos casos tuberculóides em relação aos casos virchowianos
Tumores cutâneos	-Queratoacantoma: presença de pDCs em 100% dos casos <sup>(73)</sup>  -CEC: presença de pDCs em 90% dos casos <sup>(74)</sup>  -QA: correlação entre a quantidade de pDCs recrutadas nas lesões durante o tratamento com imiquimode e o efeito terapêutico da droga <sup>(75)</sup>  -CBC: presença de pDCs ativadas produtoras de IFN- $\alpha$ no infiltrado peritumoral durante o tratamento com imiquimode <sup>(76)</sup>

Continua

		Conclusão
<b>Doenças dermatológicas</b>	pDCs	
		<p>-Melanoma: pDCs dispostas ao redor dos vasos, próximas às células tumorais, porém não ativadas. Presença associada ao crescimento tumoral. pDCs ativadas nos casos de melanoma em regressão<sup>(77)</sup></p> <p>-SK: pDCs presentes em 90% dos casos, porém expressão reduzida de MxA (possível supressão das pDCs pelo HVSK)<sup>(78)</sup></p>

Legenda: pDCs: células dendríticas plasmocitoides, LES: lúpus eritematoso sistêmico, LD: lúpus discoide, LSA: lúpus subagudo, LT: lúpus tímido, RHM: reticulo-histiocitose multicêntrica, DM: dermatomiosite, DA: dermatite atópica, EPL: erupção polimorfa à luz, PL: pitíriase liquenoide, PLEVA: pitíriase liquenoide e varioliforme aguda, PLC: pitíriase liquenoide crônica, DEVH: doença do enxerto *versus* hospedeiro, WHIM: verrugas, hipogamaglobulinemia, infecções e mielocatexia, CBM: cromoblastomicose, PCM: paracoccidiodomicose, CEC: carcinoma espinocelular, QA: queratose actínica, CBC: carcinoma basocelular, SK: sarcoma de Kaposi, HVSK: herpes vírus associado ao sarcoma de Kaposi.

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2021.

**Dias de Oliveira NF**, Miyamoto D, Maruta CW, Aoki V, Santi CG. Recurrent erythema multiforme: A therapeutic proposal for a chronic disease. *J Dermatol.* 2021;48(10):1569-1573. doi: 10.1111/1346-8138.16046.

> *J Dermatol.* 2021 Oct;48(10):1569-1573. doi: 10.1111/1346-8138.16046. Epub 2021 Jul 5.

## Recurrent erythema multiforme: A therapeutic proposal for a chronic disease

Natasha Favoretto Dias de Oliveira <sup>1</sup>, Denise Miyamoto <sup>1</sup>, Celina Wakisaka Maruta <sup>1</sup>, Valeria Aoki <sup>1</sup>, Claudia Giuli Santi <sup>1</sup>

Affiliations + expand

PMID: 34223646 DOI: 10.1111/1346-8138.16046

### Abstract

Recurrent erythema multiforme is a chronic relapsing disease that represents a therapeutic challenge. Our objective was to retrospectively evaluate the clinical-epidemiological characteristics and therapeutic response of patients with recurrent erythema multiforme and suggest a therapeutic protocol. We included patients with recurrent erythema multiforme diagnosed between January 2000 and December 2019. Clinical symptoms and a positive serology for herpes simplex virus were the inclusion criteria to initiate acyclovir in monotherapy or a combined treatment with dapsone, thalidomide, or immunosuppressants in refractory cases. Thirty-five patients were included and 71.4% were female. The median disease onset age was 35.7 years and the mean follow-up was 7.58 years. The skin was the most affected site (91.4%). Herpes simplex virus immunoglobulin (Ig)G serology was positive in 91.1% of cases. Acyclovir treatment was used in 33 of 35 patients, and complete remission was achieved in 22 of 33 after the first therapeutic course; 16 of 22 relapsed and required a second acyclovir cycle. Combined treatment with dapsone was required in nine of 33 due to partial response to acyclovir; thalidomide was an adjuvant drug in four of 33 due to adverse effects to dapsone. After the first cycle of acyclovir with or without combined therapy, 19 of 33 patients relapsed and received 2-6 additional cycles. Our results suggest that recurrent erythema multiforme presents a good response to acyclovir in monotherapy or in combined therapy with dapsone or thalidomide in the majority of patients. We propose a long-term therapeutic protocol to enable disease remission.

**Keywords:** erythema multiforme; herpes simplex; skin diseases; therapeutics; viral skin diseases.

## 7.1 INTRODUÇÃO

Eritema polimorfo recorrente (EPR) é caracterizado por surtos recorrentes ao longo do tempo. A maioria dos estudos demonstrou uma média de seis episódios por ano e uma duração média de 6 a 10 anos.

Há vários fatores etiológicos descritos, como infecções, medicações, malignidades, doenças autoimunes, radiação, imunização e menstruação<sup>(2,3)</sup>.

Estima-se que mais de 60% dos casos de EPR sejam causados por infecção pelo vírus do herpes simples (HSV). Reativações subclínicas de HSV podem representar o principal fator desencadeante em casos idiopáticos, uma vez que estudos demonstraram 50-60% de positividade para reação em cadeia de polimerase para HSV nas lesões de pele de EPR. Adicionalmente, o sucesso terapêutico com drogas antivirais nos casos de EPR corrobora essa etiologia<sup>(24)</sup>.

Atualmente, o tratamento de EPR é baseado em antivirais, corticosteroides, imunomoduladores e imunossupressores. O curso prolongado da doença e as crises recorrentes representam um desafio terapêutico. O objetivo do nosso estudo foi avaliar retrospectivamente as características clínico-epidemiológicas e a resposta terapêutica dos pacientes com EPR. Sugerimos um protocolo terapêutico para EPR baseado na nossa experiência no tratamento da doença.

## 7.2 MÉTODOS

Foram incluídos trinta e cinco pacientes com diagnóstico de EPR, em seguimento no Departamento de Dermatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2019, após aprovação pela CAPPesq (CEP – CAAE: 66313817.0.0000.0068, número: 2.204.778).

EPR foi definido de acordo com as características clínicas e histopatológicas. O critério clínico foi a presença de lesões em alvo acometendo a pele e/ou as membranas

mucosas, em pelo menos três ocasiões ao longo de 1 ano<sup>(2,5)</sup>. Pacientes que apresentaram exclusivamente acometimento oral foram classificados com EP mucoso recorrente<sup>(2)</sup>. As características histopatológicas incluíram necrose de queratinócitos na epiderme, degeneração vacuolar da camada basal e infiltrado inflamatório liquenoide<sup>(2)</sup>.

Recidivas de HSV foram avaliadas através de critérios clínicos e citológicos. O diagnóstico clínico foi estabelecido por lesões de herpes simples e/ou inclusões citopáticas virais na citologia de Tzanck. Todos os pacientes realizaram sorologia para HSV, e a positividade da sorologia (IgG $\geq$ 1,1) foi critério de inclusão apenas para iniciar o tratamento com aciclovir, e não para monitorar os surtos da doença.

As opções de tratamento incluíram: (1) aciclovir 400 mg duas vezes ao dia, com retirada de 200 mg a cada 3 meses. Nos casos em que não houve controle do EPR com aciclovir, realizamos um tratamento combinado com (2) aciclovir com dapsona 100 mg uma vez ao dia ou (3) aciclovir com talidomida 100 mg uma vez ao dia. Se os pacientes apresentassem recorrência durante a retirada do aciclovir, nós retornávamos à última dose eficaz para controle da doença, ou introduzíamos o tratamento combinado.

Um ciclo de tratamento foi definido como o período entre o início do tratamento até a retirada completa da(s) droga(s).

A resposta terapêutica durante o tratamento foi classificada como: (1) resposta completa: resolução total das lesões muco-cutâneas; (2) resposta parcial: redução do número de lesões e/ou da frequência dos surtos; (3) ausência de resposta: persistência das lesões ou inalteração na frequência dos surtos e/ou do número de lesões; (4) remissão: ausência de lesões sem o tratamento por pelo menos 3 meses.

### 7.3 RESULTADOS

Trinta e cinco pacientes com EPR foram selecionados. Houve um predomínio de mulheres (71,4%), e a média de idade no início da doença foi de 35,7 anos (3-62 anos). O tempo de seguimento médio foi de 7,58 anos (0,5-21 anos).

O principal local de acometimento da doença foi a pele (91,4%), seguida pelas mucosas oral (71,4%), genital (25,7%), ocular (8,6%) e nasal (8,6%). Um paciente apresentou eritema polimorfo recorrente mucoso. Lesões clínicas concomitantes de EPR e herpes simples foram observadas em oito pacientes, sendo que quatro desses apresentaram teste citológico positivo para HSV. Sorologia do tipo IgG para HSV foi positiva em 34 de 35 pacientes. Os dados clínicos dos pacientes estão sintetizados na tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas de 35 pacientes com EPR

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>VALOR</b>
<b>GÊNERO</b>	25 F (71,4%), 10 M (28,6%)
<b>IDADE MÉDIA DE INÍCIO DO EPR</b>	35,7 anos
<b>TEMPO MÉDIO DE SEGUIMENTO</b>	7,58 anos
<b>MÉDIA DE SURTOS/ANO</b>	5,8
<b>LOCAIS ACOMETIDOS</b>	
PELE	34 (97,2%)
MUCOSA ORAL	25 (71,4%)
MUCOSA GENITAL	9 (25,7%)
MUCOSA OCULAR	3 (8,6%)
MUCOSA NASAL	3 (8,6%)
<b>HERPES SIMPLES</b>	
LESÕES CLÍNICAS	8 (22,8%)
SOROLOGIA POSITIVA (IgG)	34 (97,2%)
TESTE CITOLÓGICO	4 (11,4%)

Legenda: Abreviações: F= feminino, M=masculino, IgG= imunoglobulina G, EPR= eritema polimorfo recorrente.

Fonte: Desenvolvido pelos autores; 2021.

O tratamento oral foi utilizado em 34 de 35 pacientes: 33 apresentaram sorologia positiva para HSV e receberam aciclovir, e um caso - com EP mucoso recorrente e sorologia negativa para HSV - foi tratado com dapsona. A remissão foi alcançada em 22/33 pacientes após o primeiro ciclo de aciclovir. Um segundo ciclo foi necessário em 16/22 pacientes que apresentaram recidiva. Tratamento combinado foi utilizado em 8/33 pacientes com resposta parcial ao aciclovir, sendo: dapsona (4/8), talidomida (1/8), dapsona seguida por talidomida (2/8), dapsona seguida por azatioprina e micofenolato de mofetila (1/8). A evolução desses pacientes está detalhada na figura 5. Os demais 3/33 pacientes ainda estavam recebendo aciclovir com resposta completa no momento da conclusão do estudo. O aciclovir foi utilizado em média por 24,9 meses no primeiro ciclo de tratamento. As recidivas ocorreram em média após 5,38 meses (0-16 meses).

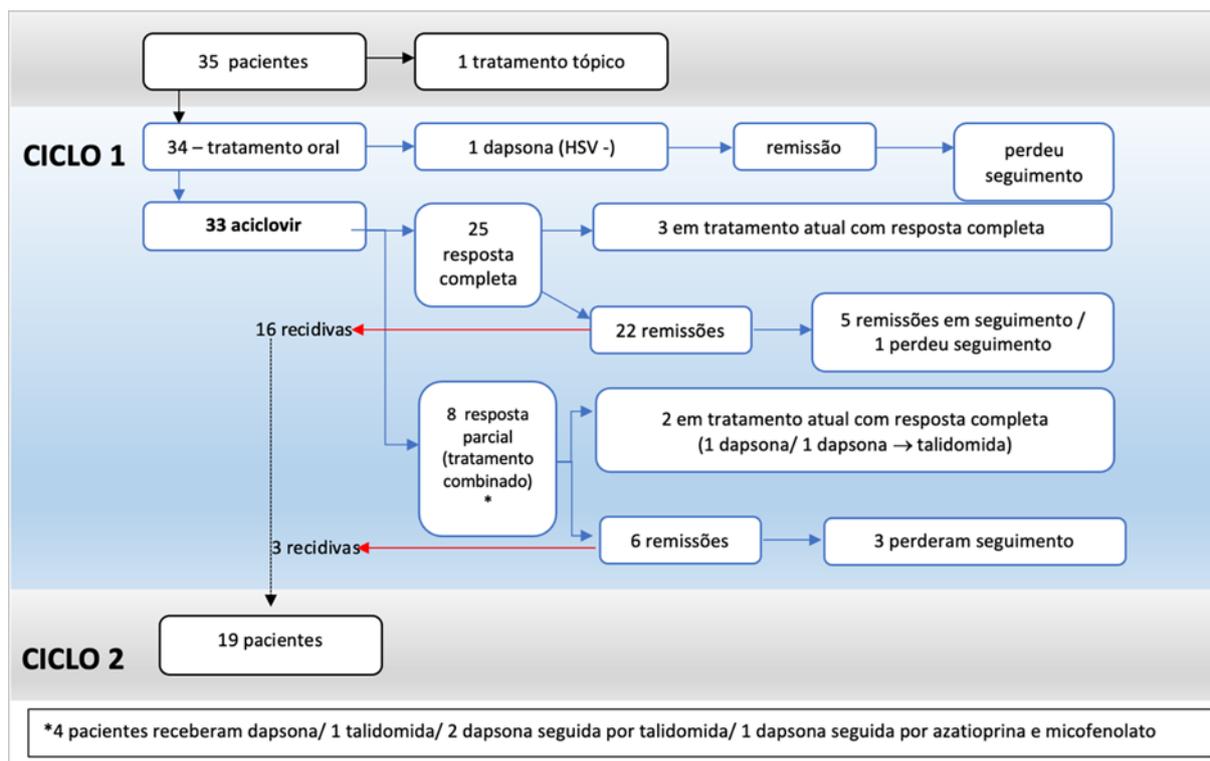
Após o primeiro ciclo de tratamento com aciclovir, com ou sem tratamento combinado, 19/33 pacientes apresentaram recidiva e receberam 2-6 ciclos adicionais de aciclovir ou tratamento combinado. Os pacientes eram monitorados periodicamente através de exames laboratoriais para avaliação renal, hepática e hematológica, e não houve efeitos adversos ao aciclovir.

O tratamento combinado com dapsona foi necessário em 9/33 pacientes, e 5/9 apresentaram efeitos adversos: 3 casos de hemólise, 1 caso de pancitopenia e 1 caso de metemoglobinemia. A talidomida foi a segunda droga prescrita como adjuvante (4/33 pacientes), e 2 pacientes apresentaram neuropatia.

Imunossupressores foram necessários em apenas uma paciente mulher em idade fértil, que apresentou hemólise por dapsona e não poderia utilizar talidomida. Nesse caso, azatioprina foi prescrita, com pouca resposta, e depois o uso de micofenolato de mofetila levou à resposta completa. Os tratamentos combinados estão detalhados na figura 6.

Ao final do período estudado, 15/33 pacientes estavam em remissão, 10 em tratamento vigente com resposta completa e 8/33 perderam seguimento.

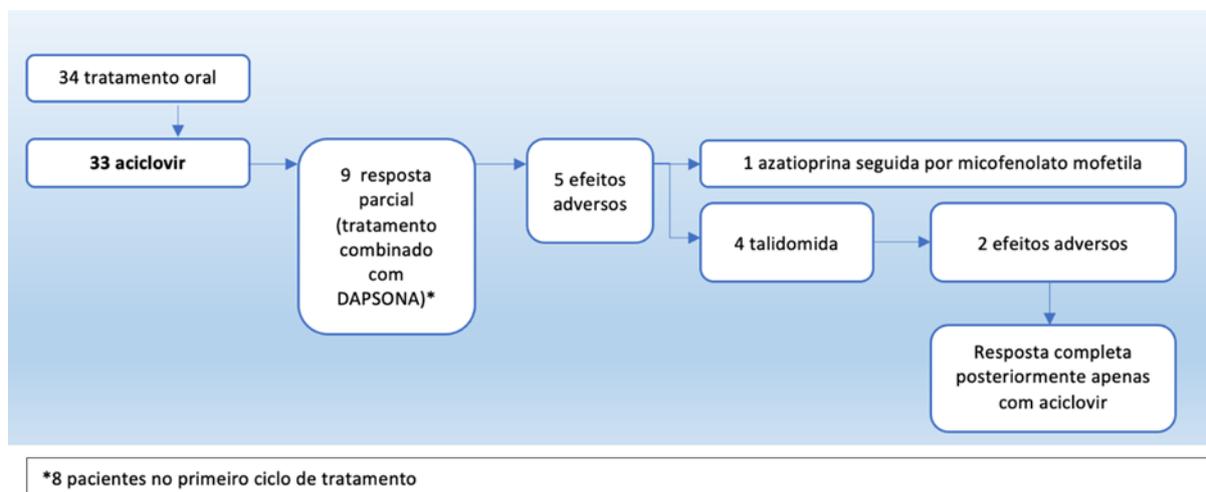
Figura 5 - Fluxograma do primeiro ciclo de tratamento oral para EPR



Legenda: O tratamento oral foi utilizado em 34/35 pacientes. 33/34 tiveram sorologia positiva para HSV e receberam aciclovir e 1/34 paciente (que apresentou EM mucoso recorrente e sorologia negativa para HSV) foi tratado com dapsona. Dentre os pacientes tratados com aciclovir, 22/33 obtiveram remissão após o primeiro curso terapêutico. 6/22 pacientes tiveram remissão sustentada após o primeiro ciclo de aciclovir (5 deles estavam em acompanhamento ao término do estudo e um paciente perdeu o acompanhamento). 16/22 pacientes tiveram recidiva e necessitaram de um segundo ciclo. Foi necessário tratamento combinado para os 8/33 pacientes que apresentaram resposta parcial ao aciclovir. HSV- = sorologia negativa para vírus do herpes simples.

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2021.

Figura 6 - Fluxograma do tratamento oral combinado do EPR



Legenda: 9/33 pacientes, com resposta parcial ao aciclovir, receberam tratamento combinado com dapsona. 5/9 apresentaram efeitos adversos (3 hemólise, 1 pancitopenia, 1 metemoglobinemia). A talidomida foi o segundo medicamento adjuvante mais utilizado (4/33), sendo que 2 pacientes apresentaram neuropatia e posteriormente apresentaram resposta completa apenas com aciclovir. Uma paciente – uma mulher em idade fértil, que portanto não poderia receber talidomida – foi tratada com azatioprina e micofenolato de mofetila após efeitos adversos à dapsona.

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2021.

## 7.4 DISCUSSÃO

A resposta ao tratamento com aciclovir para EPR em 72,7% dos casos sugere que o HSV seja o fator etiológico, especialmente porque 8/33 pacientes desenvolveram EPR concomitantemente ao quadro de herpes simples.

Embora estudos anteriores sugiram tratamento por 6 meses contínuos com aciclovir<sup>(5,6,31)</sup>, nosso estudo demonstrou que são necessários ciclos mais prolongados de aciclovir (média de 24,9 meses no primeiro ciclo, 21,7 meses no segundo ciclo e 38,1 meses no terceiro ciclo) para promover resposta completa. Esses dados sugerem que o EPR deve ser considerado uma doença crônica com tratamento prolongado e potenciais recidivas após suspensão do aciclovir, uma vez que 57,6% dos nossos pacientes necessitaram de 2-6 ciclos

de tratamento. Segundo nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar que o EPR pode demandar múltiplos ciclos de tratamento.

Corticosteroides são frequentemente prescritos para o controle do EPR<sup>(2,79)</sup>, mas comumente são insuficientes para atingir a remissão, visto que o EPR é uma doença crônica com curso prolongado. Recidivas são frequentemente observadas quando o tratamento com corticosteroides é reduzido ou descontinuado. Na casuística de Wetter e Davis<sup>(2)</sup>, apesar de 77% dos pacientes terem sido tratados com corticosteroides sistêmicos, 48% também precisaram de drogas imunossupressoras, imunomoduladoras ou anti-inflamatórias para controlar o EPR. Além disso, alguns autores<sup>(31,80)</sup> relacionaram o uso de corticosteroides com cronicidade do EPR e surtos mais longos. Tratamentos prolongados com corticosteroides podem levar a múltiplos efeitos colaterais<sup>(81)</sup> como síndrome de Cushing, osteoporose, catarata, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, glaucoma, dislipidemia e podem desencadear reativação de HSV.

Nossos dados também favorecem o uso de tratamento combinado com dapsona ou talidomida para manejo do EPR e aumento dos índices de reposta completa e remissão. Observamos que 27% dos pacientes não apresentaram resposta completa ao aciclovir, possivelmente devido à reação de hipersensibilidade tardia ao HSV<sup>(82)</sup>. A literatura e os nossos resultados demonstram que, nesses casos, drogas imunomoduladoras podem melhorar a resposta terapêutica.

A primeira escolha para tratamento combinado em todos os casos de resposta parcial ao aciclovir foi dapsona, levando ao controle da doença em 44,4% dos pacientes. Apesar de ser efetiva, os efeitos adversos hematológicos limitaram seu uso.

Talidomida foi a segunda opção de tratamento combinado devido à sua teratogenicidade, restringindo seu uso em mulheres em idade fértil. O controle da doença foi alcançado em 50% dos casos, porém metade desses apresentou neuropatia.

Diferentemente de relatos anteriores, o tratamento imunossupressor com azatioprina e micofenolato de mofetila foi necessário em apenas um caso refratário<sup>(2,5)</sup>. Há outras terapias descritas, como levamisol<sup>(33)</sup>, lenalidomida<sup>(34)</sup>, apremilast<sup>(35)</sup>, adalimumabe<sup>(36)</sup> e interferon<sup>(37)</sup>, apesar de estudos adicionais serem necessários para avaliar a segurança e eficácia dessas drogas em casos refratários.

Nossos resultados indicam que ciclos de tratamento com aciclovir longos e múltiplos são necessários para alcançar a remissão sustentada do EPR. Pacientes com resposta parcial ao aciclovir beneficiam-se do uso de tratamento combinado com dapsona e talidomida para resposta completa e remissão. Por fim, propomos um protocolo terapêutico para promover a remissão da doença.



LETTER TO THE EDITOR

**Increased expression of in situ CD123 and reduced Toll-like receptor 7/9 signalling pathway suggest impaired activation of plasmacytoid dendritic cells in recurrent erythema multiforme**

N. F. Dias de Oliveira ✉, C. G. Santi, C. W. Maruta, D. Miyamoto, N. V. Pereira, M. N. Sotto, L. F. F. da Silva, V. Aoki

First published: 26 February 2024 | <https://doi.org/10.1111/jdv.19919>**RESUMO**

*Introdução:* A fisiopatologia do eritema polimorfo recorrente (EPR) não é totalmente compreendida, e as reativações do vírus do herpes simples (HSV) são descritas como fator desencadeante na maioria dos casos idiopáticos. As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são parte da família de células dendríticas, detectam infecções virais através do reconhecimento de ácidos nucleicos virais e são mediadoras relevantes da imunidade antiviral. *Objetivos:* O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença e atividade das pDCs em paciente com EPR, através da análise imuno-histoquímica do receptor da cadeia alfa da interleucina-3 (CD123), *Toll-like receptors* (TLR) 7 e 9, interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e proteína de resistência a myxovirus A (MxA). *Métodos:* Dezenove pacientes com EPR e nove controle saudáveis (CS) foram selecionados para este estudo. Os grupos foram analisados por técnica de imuno-histoquímica com utilização de anticorpos CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$  e MxA. *Resultados:* A análise *in situ* da presença e atividade das pDCs revelou tanto na epiderme quanto na derme superficial: (i) Expressão aumentada de CD123 nas amostras de EPR, em comparação com CS; (ii) Expressão reduzida de TLR9 no grupo EPR, em comparação com CS; (iii) Expressão de TLR7, IL-6 e TNF- $\alpha$  sem diferença entre os grupos EPR e CS; (iv) Expressão aumentada de MxA no grupo EPR, em comparação com CS. *Conclusão:* pDCs estão presentes no EPR, porém com ativação comprometida pelas vias TLR7 e TLR9, possivelmente afetando a produção inicial de interferon tipo I. Esses achados podem embasar estudos futuros sobre o papel do funcionamento das vias TLR7/TLR9 e das pDCs como parte da fisiopatologia do EPR, e potencialmente promover novos alvos terapêuticos para pacientes com EPR.

## 8.1 INTRODUÇÃO

Eritema polimorfo recorrente (EPR) é caracterizado por surtos recorrentes ao longo do tempo. A maioria dos estudos demonstrou uma média de 6 episódios por ano, com duração entre 6-10 anos<sup>(2,3,29)</sup>. A fisiopatologia do EPR não é totalmente elucidada, mas as reativações subclínicas do vírus do herpes simples (HSV) podem ser o principal fator desencadeante nos casos considerados idiopáticos, uma vez que estudos demonstraram mais de 60% de positividade para HSV em lesões de pele de EPR, através de reação em cadeia da polimerase<sup>(2,4,5,7,12)</sup>.

As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são parte da família das células dendríticas e detectam infecções virais através do reconhecimento de ácidos nucleicos virais, sendo mediadoras relevantes da imunidade antiviral<sup>(8)</sup>. As pDCs exibem CD123 (receptor da cadeia alfa da interleucina-3) e são ativadas através dos *Toll-like receptors* (TLR) 7 e 9, iniciando uma sinalização que induz uma produção interferon (IFN) tipo I maior do que a de qualquer outro tipo celular, e também promovem a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL-6)<sup>(9,83)</sup>.

A proteína de resistência a myxovirus A (MxA) é uma proteína induzida por IFN tipo I, e sua confiabilidade como marcador da sinalização de IFN- $\alpha/\beta$  foi extensamente estudada, uma vez que a mensuração direta de IFN é difícil devido às baixas concentrações e meia-vida curta<sup>(47,50,51,84)</sup>.

As pDCs habitualmente não estão presentes na pele normal; elas infiltram a pele em processos de cicatrização e em diversas condições, como infecções virais, doenças inflamatórias, autoimunes e neoplásicas<sup>(39,40,83)</sup>. O IFN tipo I proveniente das pDCs inibe diretamente a infecção e ativa as funções antivirais das células NK, células dendríticas mieloides, linfócitos B e T, iniciando e orquestrando a imunidade antiviral inata e adaptativa<sup>(9,83)</sup>. Assim sendo, alterações no recrutamento e/ou no funcionamento das pDCs poderiam elucidar a persistência da infecção herpética e da resposta inflamatória que resulta no EPR.

## 8.2 OBJETIVO

O presente estudo visou avaliar a presença e a atividade *in situ* das pDCs em pacientes com EPR, através da análise imuno-histoquímica de CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$  e MxA.

## 8.3 MÉTODOS

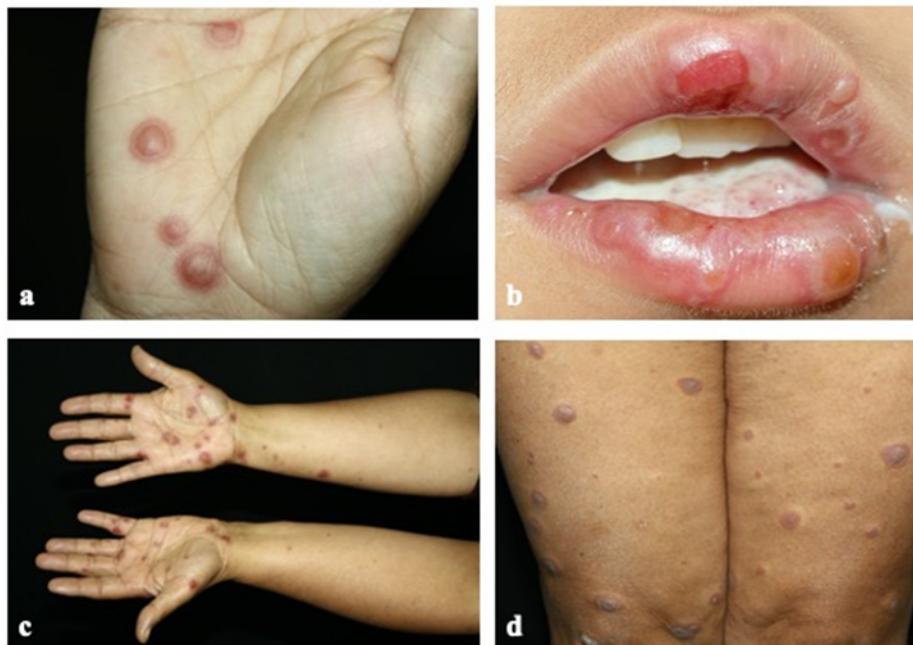
### 8.3.1 Casuística

Dezenove pacientes com EPR foram selecionados no Ambulatório de Dermatoses Autoimunes e Eritema Polimorfo do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. O diagnóstico de EPR foi estabelecido através de critérios clínicos e histopatológicos. Os critérios de inclusão consistiram em características clínicas (lesões em alvo acometendo a pele e/ou a membrana mucosa (figura 7) em pelo menos três ocasiões no período de 1 ano); características histopatológicas (apoptose da epiderme, degeneração vacuolar da camada basal e dermatite de interface vacuolar); e sorologia positiva para HSV (análise retrospectiva dos resultados de exames armazenados no prontuário médico eletrônico do Laboratório Central do HCFMUSP). Os critérios de exclusão foram: pacientes menores de 18 anos, gravidez e pacientes que não preencheram os critérios de inclusão.

O grupo de controles saudáveis (CS) foi composto por nove indivíduos saudáveis submetidos a cirurgia plástica estética no HCFMUSP, com pele excedente proveniente de mamoplastia redutora, abdominoplastia ou blefaroplastia.

Todos os indivíduos selecionados preencheram o termo de consentimento informado e concordaram em participar do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CEP – CAAE: 66313817.0.0000.0068, número: 2.204.778) e foi realizado de acordo com as normas e regulações da instituição. Os dados demográficos estão demonstrados no quadro 2.

Figura 7 - Características clínicas do eritema polimorfo recorrente



Legenda: Lesões em alvo típicas, com três zonas concêntricas acometendo a pele (a), e/ou membranas mucosas (b), simetricamente distribuídas nas regiões acrais (c) e superfícies extensoras (d).

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2023.

Quadro 2 – Dados demográficos dos pacientes com EPR

<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Sorologia para HSV</i>	<i>Lesões clínicas de HSV</i>	<i>Uso de medicações</i>	<i>Idade de início do EPR (anos)</i>	<i>Tempo de seguimento (anos)</i>	<i>Drogas prescritas para controle do EPR</i>	<i>Tempo de uso de drogas para controle do EPR (meses)</i>	<i>Ciclos de Tratamento</i>
1	F	IgG+	sim	sinvastatina	20	5	aciclovir	54	2
2	F	IgG+	sim	citalopram	46	4	aciclovir	36	1
3	F	IgG+	sim	não	43	5	aciclovir + dapsona/ talidomida	62	1
4	F	IgG+	sim	não	33	3,5	aciclovir + dapsona	25	1
5	M	IgG+	não	não	35	6	aciclovir	63	1
6	F	IgG+	sim	não	30	5,5	aciclovir	61	3
7	M	IgG+	não	não	29	4	aciclovir + dapsona	49	1
8	F	IgG+	sim	não	55	6	aciclovir	50	1
9	F	IgG+	não	losartana, hidroclorotiazida, sinvastatina	42	6,5	aciclovir	53	3
10	M	IgG+	não	não	62	6	prednisona ou corticoides tópicos durante os surtos	surtos	3

*Continua*

Paciente	Sexo	Sorologia para HSV	Lesões clínicas de HSV	Uso de medicações	Idade de início do EPR (anos)	Tempo de seguimento (anos)	Drogas prescritas para controle do EPR	Tempo de uso de drogas para controle do EPR (meses)	Conclusão
									Ciclos de Tratamento
11	M	IgG+	sim	alendronato de sódio	26	7	aciclovir	47	2
12	F	IgG+	sim	não	55	7,5	aciclovir	47	3
13	M	IgG+	não	enalapril, hidroclorotiazida, metformina	55	7,5	aciclovir	55	2
14	M	IgG+	não	não	13	9	aciclovir	65	2
15	F	IgG+	não	não	20	9	aciclovir + dapsona	53	2
16	F	IgG+	sim	não	49	12	aciclovir + dapsona/ talidomida	65	3
17	F	IgG+	não	amitriptilina, carbamazepina	38	14,5	aciclovir	46	3
18	M	IgG+	não	não	57	12,5	aciclovir	28	3
19	F	IgG+	não	não	18	14	aciclovir	39	3

Legenda: Feminino = F, masculino=M, IgG+ = anticorpos imunoglobulina G positivos para HSV. Tratamento prescrito<sup>(85)</sup>: (1) aciclovir 400 mg duas vezes ao dia com retirada de 200 mg a cada 3 meses. Nos casos em que os pacientes não apresentaram controle do EPR exclusivamente com aciclovir, prescrevemos tratamento combinado com (2) aciclovir associado a dapsona 100 mg uma vez ao dia ou (3) aciclovir associado a talidomida 100 mg uma vez ao dia. Caso os pacientes apresentassem recorrência durante a retirada do aciclovir, retornávamos à última dose suficiente para controle da doença, ou introduzíamos o tratamento combinado previamente descrito. Um ciclo de tratamento foi definido como o período entre o início do tratamento até a retirada completa da(s) droga(s) prescritas.

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2023.

### 8.3.2 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de material embebido em parafina, segundo técnica previamente descrita<sup>(86)</sup>. Foram utilizados os anticorpos primários CD123 (14-1239-82, Invitrogen, Waltham, USA, 1:50), IL-6 (21865-1-AP, Proteintech, Chicago, USA, 1:50), TLR7 (ab124928, Abcam, Cambridge, UK, 1:100), TLR9 (sc-52966, Santa Cruz, Texas, USA, 1:200), TNF- $\alpha$  (ab9635, Abcam, Cambridge, UK, 1:500) e MxA (MAFBF938, Merck, Darmstadt, Germany, 1:200).

Os sistemas de detecção utilizados foram: *Novolink Max Polymer Detection System* (cód. K0690, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) para CD123, TNF- $\alpha$  e MxA e *Reveal Biotin-free Polyvalent DAB* (SPD125, Spring Bioscience, San Francisco, CA) para IL-6, TLR7 e TLR9. A solução cromogênica utilizada foi DAB (3,3'-Diaminobenzidine, D5637, Sigma, St. Louis, MO, USA). Foram obtidas imagens microscópicas digitais de todos os fragmentos com magnificação de 20x, através do software *Pannoramic Scan – 3DHistech* (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary), e as fotografias foram analisadas através do software *Image-Pro Plus version 2.5.0.29* (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA)<sup>(87)</sup>.

### 8.3.3 Quantificação das células imunomarcadas

A imunomarcagem com CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$  e MxA foi analisada quantitativamente em duas regiões: epiderme e derme superficial. A expressão de todos os marcadores foi calculada como densidade ótica integrada (IOD - *Integrated Optic Density*) - produto da densidade de cor (DMC) pela área positiva (em  $\mu\text{m}^2$ ). Dividimos o IOD pela área positiva para obter a densidade média isoladamente, que varia numa escala de 0 a 255 (na qual 0 corresponde ao preto e 255 ao branco). A fim de distribuir área e cor em uma mesma escala, obtivemos os resultados inversos da DMC multiplicada pela área positiva. A expressão dos marcadores foi normalizada na epiderme pelo comprimento da membrana basal (expressa como  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ) e na derme superficial pela área total (expressa como

$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ). Esses índices de expressão consideram tanto intensidade de cor quanto área marcada.

#### **8.3.4 Análise estatística**

O teste de Mann–Whitney foi utilizado para comparar dois conjuntos de dados. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0.05$ .

### **8.4 RESULTADOS**

#### **8.4.1 Avaliação da presença das pDCs *in situ***

Para avaliar a presença das pDCs, nós analisamos a expressão *in situ* de CD123, detectando uma expressão significativamente aumentada nos pacientes com EPR comparados ao CS, tanto na epiderme ( $p < 0,0001$ ), quanto na derme ( $p < 0,00001$ ) (figura 8).

#### **8.4.2 Análise da ativação das pDCs *in situ* através da via TLR7**

A fim de avaliar a ativação das pDCs através da via TLR7, nós analisamos a expressão *in situ* de TLR7. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos EPR e CS, na epiderme e na derme (figura 8).

#### **8.4.3 Análise da ativação das pDCs *in situ* através da via TLR9**

Para avaliar a ativação das pDCs através da via TLR9, nós analisamos a expressão *in situ* de TLR9, que foi reduzida nos pacientes EPR em comparação aos CS, na epiderme ( $p < 0,001$ ) e na derme ( $p < 0,00001$ ) (figura 8).

#### **8.4.4 Análise *in situ* das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ )**

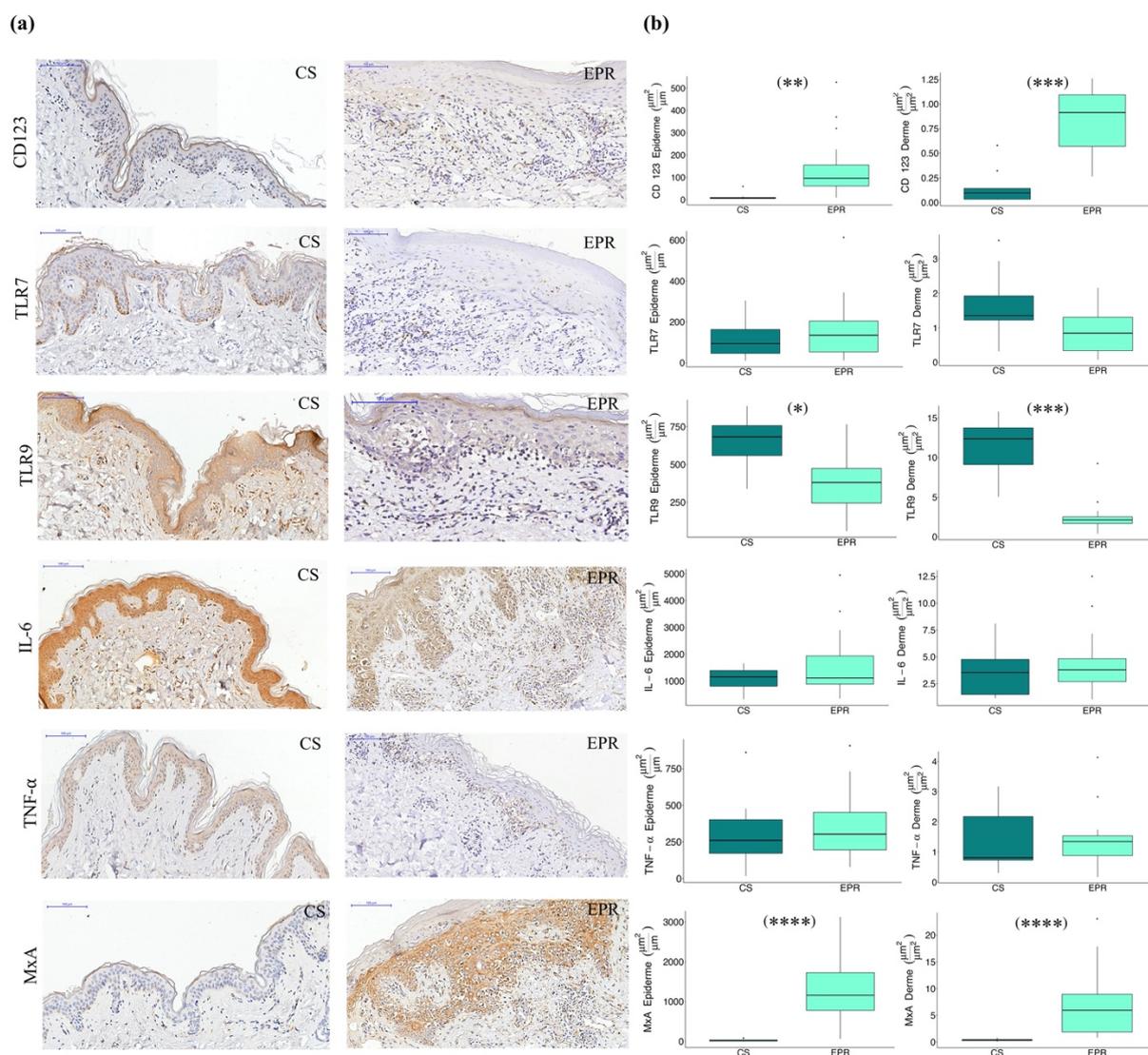
Analisamos a expressão cutânea das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ . Não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos EPR e CS, na epiderme e na derme (figura 8).

#### **8.4.5 Análise *in situ* da produção de IFN tipo I**

Por fim, analisamos a expressão de MxA, que foi significativamente maior no grupo EPR em comparação com o grupo CS ( $p < 0,000001$ ), tanto na epiderme quanto na derme (figura 8).

Os resultados estão sintetizados no quadro 3.

Figura 8 - Expressão cutânea imuno-histoquímica de CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$  e MxA



Legenda: (a) Fotografias de espécimes cutâneos de controles saudáveis (CS) e pacientes EPR (EPR). (b) Gráficos comparativos da expressão dos marcadores imuno-histoquímicas na epiderme ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ) e na derme ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ) dos grupos pacientes EPR (n=19, verde claro) e CS (n=9, verde escuro). As linhas representam a mediana com o intervalo interquartil dos marcadores nos espécimes cutâneos. CD123: receptor da cadeia alfa da interleucina-3, TLR7: *Toll-like receptor 7*, TLR9: *Toll-like receptor 9*, IL-6: interleucina 6, TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ , MxA: proteína de resistência a myxovirus A. (\*) =  $p < 0,001$ ; (\*\*) =  $p < 0,0001$ ; (\*\*\*) =  $p < 0,00001$ ; (\*\*\*\*) =  $p < 0,000001$

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2023.

Quadro 3 - Resumo dos resultados da comparação da expressão de CD123, TLR7, TLR9, IL-6, TNF- $\alpha$  e MxA na pele de doentes com EPR e nas peles de CS

<p>CD 123 – marcador da presença <i>in situ</i> das pDCs</p> <p><b><u>Expressão aumentada nos pacientes EPR em comparação aos CS</u></b></p> <p>TLR7 - análise da ativação <i>in situ</i> das pDCs através da via TLR7</p> <p><b><u>Sem diferença entre os grupos EPR e CS</u></b></p> <p>TLR9 - análise da ativação <i>in situ</i> das pDCs através da via TLR9</p> <p><b><u>Expressão reduzida nos pacientes EPR em comparação aos CS</u></b></p> <p>IL-6 - análise da produção <i>in situ</i> de citocinas pró-inflamatórias pelas pDCs</p> <p><b><u>Sem diferença entre os grupos EPR e CS</u></b></p> <p>TNF-<math>\alpha</math> - análise da produção <i>in situ</i> de citocinas pró-inflamatórias pelas pDCs</p> <p><b><u>Sem diferença entre os grupos EPR e CS</u></b></p> <p>MxA – marcador da sinalização de IFN tipo I</p> <p><b><u>Expressão aumentada nos pacientes EPR em comparação aos CS</u></b></p>
---

Legenda: pDCs: células dendríticas plasmocitoides, EPR: eritema polimorfo recorrente, CS: controles saudáveis, CD123: receptor da cadeia alfa da interleucina-3, TLR7: *Toll-like receptor 7*, TLR9: *Toll-like receptor 9*, IL-6: interleucina 6, TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ , MxA: proteína de resistência a myxovirus A, IFN: interferon

Fonte: Desenvolvido pelos autores, 2023.

## 8.5 DISCUSSÃO

Apesar de ainda haver muitos fatores a serem esclarecidos na fisiopatologia do EPR, estima-se que mais de 60% dos casos sejam causados por infecção por HSV<sup>(1,4)</sup>. Adicionalmente, o sucesso do tratamento com drogas antivirais nos pacientes com EPR corrobora a atuação do HSV na etiologia da doença<sup>(6,31,82,85)</sup>.

Nossos pacientes demonstraram sorologia positiva para HSV em 100% dos casos e aproximadamente 70% de controle da doença com monoterapia com aciclovir<sup>(85)</sup> (tabela 3). Poucos pacientes com EPR apresentaram histórico de uso de medicações, e nesses casos os surtos de EPR não tiveram relação temporal com a utilização da droga. Ademais, nossos pacientes com EPR não apresentaram aumento de expressão tecidual de TNF- $\alpha$  em comparação com os CS, previamente descrito como marcador eritema polimorfo (EP) relacionado a drogas<sup>(82)</sup>, o que reforça a etiologia por HSV. A suscetibilidade genética pode ter um papel nos casos de EPR, uma vez que estudos demonstraram associação entre EPR induzido por HSV e HLA-DQ\*0301<sup>(26)</sup>, HLA- DQB1\*0302 e DQB1\*0402<sup>(28)</sup>.

Em relação ao EPR induzido por HSV, sabe-se que células mononucleares do sangue periférico, como células CD34+ (*cluster of differentiation 34*), conhecidas como progenitoras de células de Langerhans, fagocitam o HSV após a infecção clínica ou subclínica. Assim, o DNA viral é fragmentado e transportado para locais distantes da pele. A expressão de genes da DNA polimerase do HSV nos queratinócitos leva ao recrutamento de linfócitos Th1 CD4+ específicos, que produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e promovem o sequestro de leucócitos, monócitos e células NK. Múltiplos fatores podem determinar a ocorrência de EP subsequente à infecção por HSV, incluindo o aumento de macrófagos e células de Langerhans CD34+ que fagocitam o DNA do HSV<sup>(30)</sup>, a fragmentação incompleta do DNA do HSV pelos fagócitos e a expressão na pele de proteínas virais com epítomos similares às proteínas celulares<sup>(2,29)</sup>.

Em contrapartida, o EP associado a drogas tem um mecanismo diferente, envolvendo a expressão de linfócitos Th1 CD8+ e a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos e macrófagos, levando ao recrutamento preferencial de neutrófilos para a pele lesional<sup>(29,82)</sup>.

O EPR também pode representar uma reação de hipersensibilidade tardia a antígenos do HSV, com correlação entre a duração das lesões de EP e a ativação de um receptor de

célula T específico (V $\beta$ 2). A produção subsequente de citocinas e quimiocinas, como IFN- $\gamma$ , pode recrutar células T auto reativas, assim amplificando a resposta inflamatória<sup>(1,7,82)</sup>.

A atividade antiviral das pDCs ocorre não somente pela produção de IFN tipo I, mas também através de outros efeitos indiretos importantes, como ativação de células NK, estímulo de macrófagos e células dendríticas, atuação de células apresentadoras de antígenos, diferenciação de linfócitos T citotóxicos e Th1, aumento e estímulo de plasmócitos produtores de anticorpos<sup>(9,83)</sup>. Em contraste com as células dendríticas convencionais (cDC), a ativação e migração das pDCs é positivamente reforçada por IFN- $\alpha$ <sup>(9)</sup>.

A presença de pDCs no EP foi detectada em estudos prévios. Tomasini et al.<sup>(40)</sup> demonstraram a presença de 5-10% de pDCs em distribuição liquenoide no infiltrado linfocítico do EP (etiologia não descrita), através da expressão imuno-histoquímica de CD123. Os autores fizeram a hipótese de que a persistência das células apoptóticas poderia induzir a retroalimentação positiva pelas pDCs, até o clareamento completo do desencadeante viral ou farmacológico.

Zengin, Pukhalskaya e Smoller<sup>(88)</sup> também descreveram a presença de pDCs na epiderme e na derme superficial no EP, possivelmente regulando o processo inflamatório da doença. As pDCs foram observadas no EP de diferentes etiologias (causados por HSV, outros agentes infecciosos, drogas e idiopáticos), com diferença significativa no número de pDCs em EPs induzidos por vírus, em comparação com EP de etiologia não viral. Esse achado pode sugerir que patógenos infecciosos ou determinadas drogas possam ativar os queratinócitos através de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados a danos) e recrutar pDCs para a resposta inflamatória.

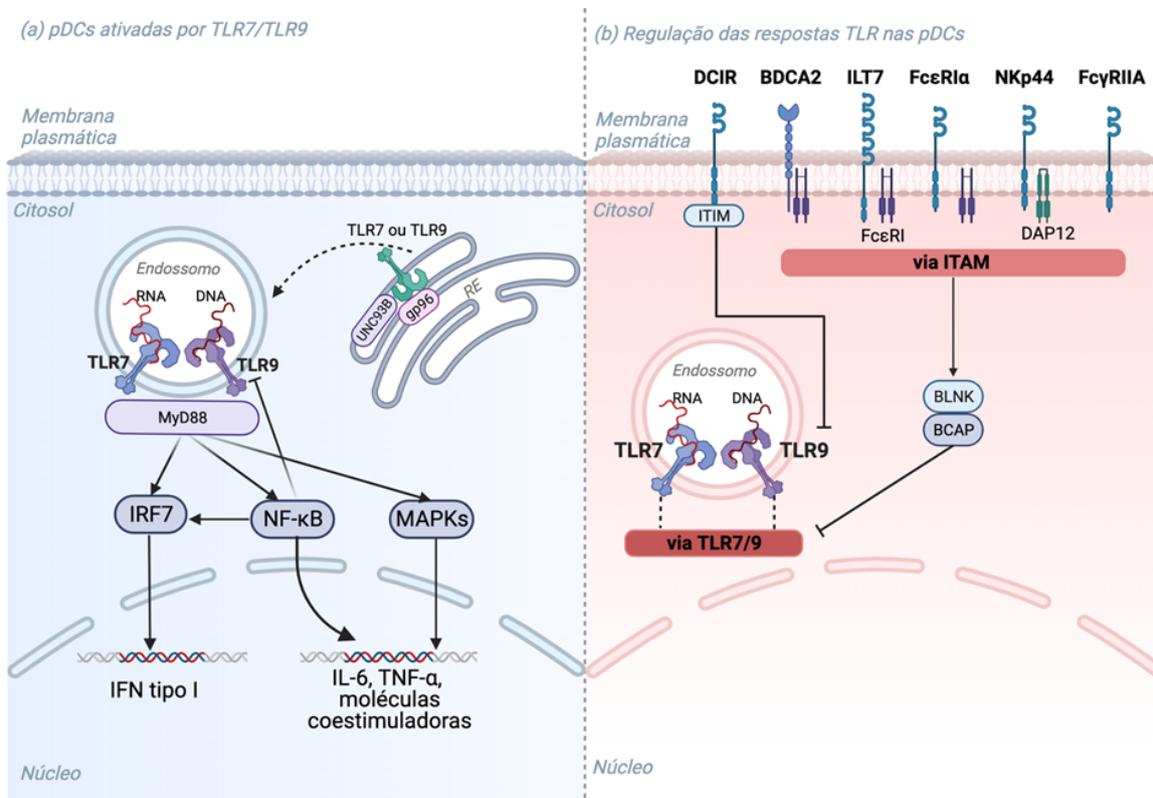
Nosso estudo detectou a presença de pDCs na pele dos pacientes com EP, tanto na epiderme quanto na derme, em concordância com os estudos anteriores. A fim de explorar a ativação das pDCs no EPR, nós analisamos as vias TLR7 e 9. Interessantemente, nós encontramos expressão reduzida de TLR9 nos pacientes com EPR em comparação com CS, enquanto a expressão de TLR7 foi igual entre os grupos.

As pDCs são ativadas através dos receptores TLR7 e TLR9. O TLR7 responde a RNA viral, como influenza e vírus sincicial respiratório, enquanto o TLR9 detecta moléculas de DNA contendo sítios CpG não metilados, comumente encontrado em genomas de vírus como HSV<sup>(8)</sup>. Após a exposição a vírus ou agonistas sintéticos, TLR7 e 9, originalmente alocados

no retículo endoplasmático, são realocados para os endossomos e clivados pelas proteases lisossomais. As modificações conformacionais de TLR7 e TLR9 ativam o MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88), levando à propagação de sinais subsequentes, com ativação de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos), NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) e IRF7 (fator regulador 7 de interferon). A ativação de IRF7 leva à produção de IFN tipo I. A translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo estimula positivamente TLR7 e a produção de citocinas pro inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), mas regula negativamente TLR9 (figura 9)<sup>(8,89)</sup>.

A regulação da sinalização via TLR9 é necessária para respostas antivirais adequadas e para prevenir a expressão excessiva de IFN- $\alpha$ , que é observada em doenças sistêmicas autoimunes, como lúpus e psoríase<sup>(89)</sup>. A sinalização via TLR7 e TLR9 é regulada negativamente através de *crosslinking* dos receptores reguladores das pDCs. Os receptores BDCA-2, ILT7 (transcrito semelhante à imunoglobulina 7) e Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  (receptor  $\alpha$  de alta afinidade para a porção Fc de IgE) associam-se à cadeia  $\gamma$  do adaptador do Fc $\epsilon$ RI (receptor de alta afinidade para a porção Fc de IgE), que apresenta um ITAM (motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina), enquanto o NKp44 humano se liga a DAP12, outra proteína adaptadora que contém ITAM. A ativação desses receptores, e também de FC $\gamma$ RIIA (receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G) estimula a via mediada por ITAM, que eficientemente inibe a produção de IFN tipo I, TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>(9,89)</sup>. DCIR (imunorreceptor de células dendríticas) é outro receptor regulador de pDCs, que contém um ITIM (motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina), e medeia exclusivamente a inibição de TLR9 (figura 9)<sup>(8,89)</sup>.

Figura 9 - Vias TLR7/TLR9 nas pDCs (células dendríticas plasmocitoides) ativadas e regulação das respostas TLR nas pDCs



Legenda: (a) Vias TLR7/TLR9 nas pDCs (células dendríticas plasmocitoides) ativadas: os *Toll-like receptors* (TLR) 7 e TLR9 residem no retículo endoplasmático (RE) nas pDCs não ativadas, associados a gp96 e UNC93B (homólogo B de UNC-93). Após a exposição viral, TLR7 e TLR9 são realocados para o endossomo. As alterações conformacionais dos TLRs levam à ativação de MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88), levando à propagação de sinais subsequentes. A translocação de IRF7 (fator regulador 7 de interferon) inicia a produção de interferon (IFN) tipo I. A ativação de NF-κB (fator nuclear kappa B) e MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) leva à produção de IL-6 (interleucina 6) e TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) e expressão de moléculas coestimuladoras. A translocação de NF-κB para o núcleo regula negativamente a expressão de TLR9; (b) Regulação das respostas TLR nas pDCs: Os receptores de superfície celular BDCA-2 (antígeno de células dendríticas sanguíneas 2), ILT7 (transcrito semelhante à imunoglobulina 7) e FcεRIα (receptor α de alta afinidade para a porção Fc de IgE) associam-se à cadeia γ do adaptador do FcεRI (receptor de alta afinidade para a porção Fc de IgE), que apresenta um ITAM (motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina). O receptor NKp44 humano se liga a DAP12, outra proteína adaptadora que contém ITAM. A ativação desses receptores ativa a via mediada por ITAM - via semelhante ao receptor de células B - que envolve principalmente BLNK (ligante de células B) e BCAP (adaptador de célula B) e inibe a produção de IFN tipo I, TNF-α e IL-6. O DCIR (imunorreceptor de células dendríticas) é outro receptor regulador de pDCs, que contém um ITIM (motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina) e medeia a inibição de TLR9.

Fonte: Adaptado de Hirsch et al.<sup>(89)</sup> e Gilliet et al.<sup>(8)</sup>.

TLR 7 é expresso na pele normal<sup>(90)</sup>. Tang et al.<sup>(91)</sup> demonstraram que a via de TLR7 das pDCs não está significativamente ativada nas verrugas vulgares (VV), assim predispondo à recorrência e recidiva das lesões de VV. TLR9 é fracamente expresso na camada basal e na camada espinhosa inferior na epiderme normal, e é aumentado nas doenças virais<sup>(90,91)</sup>, como VV e molusco contagioso. Em contraste, a via de sinalização de TLR9 é regulada negativamente em doenças alérgicas, como na urticária<sup>(92)</sup>, e também na infecção por HPV16 (papilomavírus humano 16), levando à persistência da infecção viral<sup>(89)</sup>. Estudos demonstraram que outros vírus, como vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e vírus da imunodeficiência humana podem seletivamente bloquear a habilidade das pDCs em produzir IFN- $\alpha$  em resposta a TLR9, mas não a agonistas TLR7<sup>(89)</sup>.

Lund et al.<sup>(93)</sup> demonstraram que a expressão de TLR9 pelas pDCs é necessária para a produção de IFN- $\alpha$  pelas pDCs em resposta ao HSV-2. Adicionalmente, Rasmussen et al.<sup>(94)</sup> demonstraram que a infecção por HSV promove a produção inicial de IFN principalmente pelas pDCs através da ativação de TLR9, enquanto a produção subsequente de interferon é independente de TLR9 e envolve fibroblastos, macrófagos e cDCs<sup>(94,95)</sup>. Previamente foi demonstrado que murinos com genes *knockout* para TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>) apresentaram resposta do hospedeiro reduzida para HSV-2 em um modelo para herpes genital<sup>(93)</sup>. Em humanos, contudo, os efeitos da redução de TLR9 ainda não foram totalmente elucidados. Pacientes com deficiência da cinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK-4) (não responsivos a TLR7, TLR8 e TLR9) aparentemente apresentam resistência normal à maioria dos vírus, incluindo HSV-1, enquanto pacientes com deficiência de UNC93B (não responsivos a TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) são predispostos à encefalite por HSV-1, apesar da penetrância ser incompleta<sup>(96)</sup>.

Nossos resultados demonstraram expressão de TLR9 reduzida nos pacientes com EPR, sem aumento de TLR7, IL-6 e TNF- $\alpha$ , indicando a presença de pDCs possivelmente com ativação comprometida ou reguladas negativamente. Baixos níveis de TNF- $\alpha$  são presentes nas camadas superiores da epiderme na pele normal<sup>(97)</sup>; similarmente, IL-6 é presente na pele humana sadia em queratinócitos basais, células endoteliais, fibroblastos e células mononucleares<sup>(83,98)</sup>.

Todavia, nossos dados demonstraram aumento significativo da expressão de MxA tanto na epiderme quanto na derme no grupo EPR em comparação ao grupo CS. Nas células humanas há dois genes induzíveis por IFN que codificam proteínas de resistência a

myxovirus (Mx): MxA e MxB. A proteína MxA é expressa no citoplasma e tem uma atividade antiviral intrínseca a alguns vírus. *In vivo*, as proteínas Mx são sintetizadas em resposta ao IFN endógeno (produzido durante infecções virais) ou ao tratamento com IFN- $\alpha/\beta$ . Diversos estudos estabeleceram a MxA como um marcador confiável da atividade de IFN tipo I<sup>(50,55,60,61,84)</sup>.

Estudos anteriores<sup>(99,100)</sup> demonstraram que a sinalização de IFN inibe a replicação do HSV. Ku et al.<sup>(101)</sup> demonstraram que a MxA induzida por IFN- $\alpha$  inibe o HSV-1, e também descreveram um novo mecanismo de escape do HSV das defesas antivirais. Esse mecanismo é baseado na expressão de um transcrito de *splicing* alternativo do gene do hospedeiro, que induz a expressão de uma isoforma de MxA variante (varMxA). varMxA não somente não apresenta a função efetora antiviral da MxA induzido por IFN- $\alpha$ , mas também favorece – ao invés de bloquear – a replicação de HSV-1.

## 8.6 CONCLUSÃO

Considerando-se os achados previamente mencionados - pDCs aumentadas, expressão reduzida de TLR9, expressão de MxA elevada e expressão normal de TLR7, IL-6 e TNF- $\alpha$  - sugerimos que os pacientes com EPR possam ter uma ativação prejudicada das pDCs através da via TLR9 em resposta ao HSV, afetando a produção inicial de IFN tipo I. Essa produção inicial reduzida de IFN tipo I poderia favorecer a expressão de varMxA, beneficiando a persistência de HSV e os episódios de EPR. A MxA detectada poderia tanto representar varMxA ou IFN tipo I produzido por outros tipos celulares, como macrófagos, fibroblastos e cDCs.

De acordo com nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a descrever a presença e perfil de ativação *in situ* das pDCs no EPR. Estudos adicionais em relação à expressão reduzida de TLR9 nesses pacientes podem contribuir para a elucidação da fisiopatologia do EPR e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos<sup>(9)</sup> para essa doença refratária.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo clínico e fisiopatológico do EPR pode contribuir para além da melhor compreensão da própria doença. Ao avançarmos no entendimento sobre a atuação das células dendríticas plasmocitoides, estudamos também as intrincadas interações entre as imunidades inata e adaptativa, e como suas alterações podem implicar em alterações no controle de infecções e de tumores, bem como no desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes.

Ademais, os estudos relacionados à complexa fisiopatologia do EPR tiveram início há mais de trinta anos, e ainda há muitas questões a serem respondidas. Há alterações genéticas especificamente relacionadas ao EPR? Quais fatores estão relacionados ao desencadeamento da doença em determinado momento da vida? O que determina os episódios de reativação da doença? Por que muitos pacientes são infectados por HSV, mas apenas alguns manifestam EPR?

Especificamente em relação à via TLR9, ainda é preciso avançar no esclarecimento da alteração específica envolvida na regulação negativa e/ou falta de ativação, também já verificada em outras doenças virais. Há mutações genéticas que predisponham a alterações na via TLR9? Quais seriam os fatores que determinam o bloqueio/falta de ativação dessa via nos pacientes com EPR? Seriam componentes envolvendo a interação com o MyD88? Ou via receptores associados ao ITAM ou ao ITIM?

O progresso na compreensão da fisiopatologia do EPR pode contribuir para melhor controle das doenças causadas pelo vírus do herpes simples e por outros vírus. O entendimento dos mecanismos de diferenciação, recrutamento e ativação das pDCs, assim como da interação entre o vírus do herpes simples e hospedeiro podem proporcionar novos alvos terapêuticos para diversas doenças.

## 10 DISCUSSÃO FINAL

A importância das células dendríticas plasmocitoides na dermatologia vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. Sintetizamos os estudos realizados acerca de sua presença e atividade nas mais diversas doenças dermatológicas – inflamatórias, autoimunes, neoplásicas e infecciosas – para melhor compreensão de seu papel nas imunidades inata e adaptativa.

Descrevemos uma casuística brasileira de EPR, contribuindo com a publicação de características clínicas, dados demográficos e de tratamento. Descrevemos que o EPR pode demandar múltiplos ciclos de tratamento. Adicionalmente, propusemos nesse projeto um novo protocolo de tratamento, com ciclos prolongados de aciclovir com redução paulatina da dose, e associação com dapsona e talidomida. Assim, atingimos altas taxas de controle da doença, de maneira segura e eficaz.

Por fim, avaliamos a presença e a atividade *in situ* das pDCs em pacientes com EPR, através da análise imuno-histoquímica. Verificamos a presença das pDCs na pele de pacientes com EPR através da expressão aumentada de CD123 por técnica de imuno-histoquímica, em concordância com dados anteriores da literatura. Avançamos – pela primeira vez, segundo nosso conhecimento – na análise do funcionamento das pDCs na pele dos pacientes com EPR, e encontramos redução da sua atividade através das vias TLR7 e TLR9. Sugerimos então que a redução da atividade das pDCs no EPR possa dificultar o combate ao HSV e favorecer os surtos de EPR. Através desse estudo, contribuímos com um aspecto importante da complexa fisiopatologia do EPR, que futuramente poderá proporcionar novos alvos terapêuticos para essa doença desafiadora.

## REFERÊNCIAS

1. Sokumbi O, Wetter DA. Clinical features, diagnosis, and treatment of erythema multiforme: a review for the practicing dermatologist. *Int J Dermatol*. 2012;51(8):889-902.
2. Wetter DA, Davis MDP. Recurrent erythema multiforme: clinical characteristics, etiologic associations, and treatment in a series of 48 patients at Mayo Clinic, 2000 to 2007. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(1):45-53.
3. Auquier-Dunant A, et al. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study. *Arch Dermatol*. 2002;138(8):1019-24.
4. Schofield JK, Tatnall FM, Leigh IM. Recurrent erythema multiforme: clinical features and treatment in a large series of patients. *Br J Dermatol*. 1993;128(5):542-5.
5. Schofield JK, et al. Recurrent erythema multiforme: tissue typing in a large series of patients. *Br J Dermatol*. 1994;131(4):532-5.
6. Huff JC. Acyclovir for recurrent erythema multiforme caused by herpes simplex. *J Am Acad Dermatol*. 1988;18(1 Pt 2):197-9.
7. Kokuba H, et al. Erythema multiforme lesions are associated with expression of a herpes simplex virus (HSV) gene and qualitative alterations in the HSV-specific T-cell response. *Br J Dermatol*. 1998;138(6):952-64.
8. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: Sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):594-606.
9. Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ. Signalling pathways leading to IFN- $\alpha$  production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med*. 2009;265(1):43-57.
10. von Hebra F. On diseases of the skin including the exanthemata. London: New Sydenham Soc; 1866. Chapter XII, On the polymorphous erythemata; 285-9.
11. Wright L, Jenkins S. Erythema multiforme exudativum. *J Pediatr*. 1951;38(3):310-4.
12. Huff JC, Weston WL, Tonnesen MG. Erythema multiforme: a critical review of characteristics, diagnostic criteria, and causes. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8(6):763-75.
13. Stevens AM, Johnson FC. A new eruptive fever associated with stomatitis and ophthalmia: report of two cases in children. *Am J Dis Child*. 1922;24(6):526-33.
14. Thomas BA. The so-called Stevens-Johnson syndrome. *Br Med J*. 1950;1(4667):1393-7.

15. Bastuji-Garin S, et al. Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme. *Arch Dermatol.* 1993;129(1):92–6.
16. Roujeau JC. The spectrum of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a clinical classification. *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):28S-30S.
17. Rivitti EA, editor. *Dermatologia de Sampaio e Rivitti.* 4. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2018. Erupções eritematopapulonodulares; p. 246–9.
18. Levin J, Hofstra T. Recurrent erythema multiforme. *JAMA.* 2014;312(4):426–7.
19. Lemak MA, Duvic M, Bean SF. Oral acyclovir for the prevention of herpes-associated erythema multiforme. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15(1):50–4.
20. Rogers 3<sup>rd</sup> RS. Pseudo-Behçet's disease. *Dermatol Clin.* 2003;21(1):49–61.
21. Miura S, et al. Detection of viral DNA within skin of healed recurrent herpes simplex infection and erythema multiforme lesions. *J Invest Dermatol.* 1992;98(1):68–72.
22. Brice S, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in cutaneous lesions of erythema multiforme. *J Invest Dermatol.* 1989;93(1):183–7.
23. Darragh TM, et al. Identification of herpes simplex virus DNA in lesions of erythema multiforme by the polymerase chain reaction. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(1):23–6.
24. Aslanzadeh J, et al. Detection of HSV-specific DNA in biopsy tissue of patients with erythema multiforme by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol.* 1992;126(1):19–23.
25. Imafuku S, et al. Expression of herpes simplex virus DNA fragments located in epidermal keratinocytes and germinative cells is associated with the development of erythema multiforme lesions. *J Invest Dermatol.* 1997;109(4):550–6.
26. Khalil I, et al. HLA DQB1\*0301 allele is involved in the susceptibility to erythema multiforme. *J Invest Dermatol.* 1991;97(4):697–700.
27. Legendre C, Russell AS, Jeannet M. HLA antigens in patients with recrudescing herpes simplex infections. *Tissue Antigens.* 1982;19(1):85–9.
28. Malo A, Kämpgen E, Wank R. Recurrent herpes simplex virus-induced erythema multiforme: different HLA-DQB1 alleles associate with severe mucous membrane versus skin attacks. *Scand J Immunol.* 1998;47(5):408–11.
29. Aurelian L, Ono F, Burnett J. Herpes simplex virus (HSV)-associated erythema multiforme (HAEM): a viral disease with an autoimmune component. *Dermatol Online J.* 2003;9(1):1.
30. Ono F, et al. CD34+ cells in the peripheral blood transport herpes simplex virus DNA fragments to the skin of patients with erythema multiforme (HAEM). *J Invest Dermatol.* 2005;124(6):1215–24.

31. Tatnall FM, Schofield JK, Leigh IM. A double-blind, placebo-controlled trial of continuous acyclovir therapy in recurrent erythema multiforme. *Br J Dermatol.* 1995;132(2):267–70.
32. Oak ASW, Seminario-Vidal L, Sami N. Treatment of antiviral-resistant recurrent erythema multiforme with dapsone. *Dermatol Ther.* 2017;30(2):1–4.
33. Liu RF, et al. The effect of levamisole in the treatment of recalcitrant recurrent erythema multiforme major: an observational study. *J Dermatol Sci.* 2018; 92(1):38–44.
34. Drahy F, et al. Lenalidomide as an alternative to thalidomide for treatment of recurrent erythema multiforme. *JAMA Dermatol.* 2018;154(4):487–9.
35. Chen T, Levitt J, Geller L. Apremilast for treatment of recurrent erythema multiforme. *Dermatol Online J.* 2017;23(1):1–4.
36. Baillis B, Maize Sr JC. Treatment of recurrent erythema multiforme with adalimumab as monotherapy. *JAAD Case Reports.* 2017;3(2):95–7.
37. Kieny A, Lipsker D. Efficacy of interferon in recurrent valaciclovir-refractory erythema multiforme in a patient not infected with hepatitis C virus. *Clin Exp Dermatol.* 2016;41(6):648–50.
38. Lennert K, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta Haematol.* 1958;19(2):99–113.
39. Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(6):392–404.
40. Tomasini D, et al. Plasmacytoid dendritic cells: an overview of their presence and distribution in different inflammatory skin diseases, with special emphasis on Jessner's lymphocytic infiltrate of the skin and cutaneous lupus erythematosus. *J Cutan Pathol.* 2010;37(11):1132–9.
41. Feller AC, et al. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology.* 1983;7(6):825–39.
42. Facchetti F, et al. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol.* 1988;133(1):15–21.
43. Saadeh D, Kurban M, Abbas O. Update on the role of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory/autoimmune skin diseases. *Exp Dermatol.* 2016;25(6):415–21.
44. Massone C, et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: A new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol.* 2010;32(3):251–6.
45. Mitchell D, Chintala S, Dey M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J Neuroimmunol.* 2018;322:63–73.
46. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):471–85.

47. McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol*. 2008;35(5):452–6.
48. Rowland SL, et al. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *J Exp Med*. 2014;211(10):1977–91.
49. Walsh NM, et al. Plasmacytoid dendritic cells in hypertrophic discoid lupus erythematosus: an objective evaluation of their diagnostic value. *J Cutan Pathol*. 2015;42(1):32–8.
50. Farkas L, et al. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- $\alpha/\beta$ -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol*. 2001;159(1):237–43.
51. Wenzel J, et al. Type I interferon-associated skin recruitment of CXCR3+ lymphocytes in dermatomyositis. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(4):576–82.
52. De Vries HJC, et al. Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells. *Br J Dermatol*. 2006;154(2):361–4.
53. De Vries HJC, et al. Lichen planus remission is associated with a decrease of human herpes virus type 7 protein expression in plasmacytoid dendritic cells. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(4):213–9.
54. Wang Y, et al. Increased infiltration of CD11 c+/CD123+ dendritic cell subsets and upregulation of TLR/IFN- $\alpha$  signaling participate in pathogenesis of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125(5):459-67.
55. Badr D, et al. Plasmacytoid dendritic cells and type I interferon signature in lichen striatus. *Pediatr Dermatol*. 2016;33(3):301–6.
56. Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(2 Suppl 2):171–6.
57. Wollenberg A, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2002;119(5):1096–102.
58. Wackernagel A, et al. Plasmacytoid dendritic cells are absent in skin lesions of polymorphic light eruption. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007;23(1):24–8.
59. Rossi MT, et al. Cutaneous infiltration of plasmacytoid dendritic cells and T regulatory cells in skin lesions of polymorphic light eruption. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2018;32(6):985–91.
60. Nestle FO, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- $\alpha$  production. *J Exp Med*. 2005;202(1):135-43.
61. Heier I, et al. Sun exposure rapidly reduces plasmacytoid dendritic cells and

- inflammatory dermal dendritic cells in psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 2011;165(4):792–801.
62. Albanesi C, et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med.* 2009;206(1):249–58.
  63. Wenzel J, et al. The role of cytotoxic skin-homing CD8<sup>+</sup> lymphocytes in cutaneous cytotoxic T-cell lymphoma and pityriasis lichenoides. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(3):422–7.
  64. Haller O, Kochs G. Human MxA protein: An interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):79–87.
  65. Karouni M, et al. Possible role of plasmacytoid dendritic cells in pityriasis lichenoides. *Clin Exp Dermatol.* 2018;43(4):404-9.
  66. Malard F, et al. Increased plasmacytoid dendritic cells and ROR $\gamma$ t-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol.* 2013;94(6):1337–43.
  67. Mohty M, et al. Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2005;19(1):1–6.
  68. Botari CME, et al. Oral chronic graft-versus-host disease: analysis of dendritic cells subpopulations. *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):632–7.
  69. Saadeh D, Kurban M, Abbas O. Plasmacytoid dendritic cells and type I interferon in the immunological response against warts. *Clin Exp Dermatol.* 2017;42(8):857–62.
  70. Tassone L, et al. Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood.* 2010;116(23):4870–3.
  71. Pagliari C, et al. Plasmacytoid dendritic cells in cutaneous lesions of patients with chromoblastomycosis, lacaziosis, and paracoccidioidomycosis: a comparative analysis. *Med Mycol.* 2014;52(4):397–402.
  72. Hirai KE, et al. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. *Microb Pathog.* 2016;91:18–25.
  73. Abbas O, et al. Plasmacytoid dendritic cell involvement in the host response against keratoacanthoma. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(6):1142–5.
  74. Fraga GR, Chow P. Plasmacytoid dendritic cells in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma: a blinded study of CD123 as a diagnostic marker. *J Cutan Pathol.* 2020;47(1):17–21.
  75. Ogawa Y, et al. Recruitment of plasmacytoid dendritic cells to skin regulates treatment responsiveness of actinic keratosis to imiquimod. *J Dermatol Sci.* 2014;76(1):67–9.

76. Stary G, et al. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204(6):1441–51.
77. Di Domizio J, Demaria O, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells in melanoma: can we revert bad into good? *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1797–800.
78. Karouni M, Kurban M, Abbas O. Plasmacytoid dendritic cells in skin lesions of classic Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(7):487–92.
79. Uemura T, Nagayama M, Kawashima M. A case of herpes-associated erythema multiforme in a Japanese child. *J Dermatol*. 1993;20(8):478–82.
80. Farthing PM, et al. Characteristics of the oral lesions in patients with cutaneous recurrent erythema multiforme. *J Oral Pathol Med*. 1995;24(1):9–13.
81. Sen P, Chua SH. A case of recurrent erythema multiforme and its therapeutic complications. *Ann Acad Med Singap*. 2004;33(6):793–6.
82. Kokuba H, Aurelian L, Burnett J. Herpes simplex virus associated erythema multiforme (HAEM) is mechanistically distinct from drug-induced erythema multiforme: interferon- $\gamma$  is expressed in HAEM lesions and tumor necrosis factor- $\alpha$  in drug-induced erythema multiforme lesions. *J Invest Dermatol*. 1999;113(5):808–15.
83. Dias de Oliveira NF, et al. Plasmacytoid dendritic cells in dermatology. *An Bras Dermatol*. 2021;96(1):76–81.
84. Fah J, Pavlovic J, Burg G. Expression of MxA protein in inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(1):47–52.
85. Dias de Oliveira NF, et al. Recurrent erythema multiforme: a therapeutic proposal for a chronic disease. *J Dermatol*. 2021;48(10):1569–73.
86. Pagliari C, et al. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog*. 2011;50(5):263–7.
87. Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research - a review. *J Med Syst*. 2012;36(4):2621–31.
88. Zengin HB, Pukhalskaya T, Smoller BR. Role of CD123 (+) plasmacytoid dendritic cells in etiologically different variants of erythema multiforme: a monocentric retrospective study. *Dermatopathology*. 2021;8(2):89–96.
89. Hirsch I, et al. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol*. 2010;31(10):391–7.
90. Ku JK, et al. Expression of Toll-like receptors in verruca and molluscum contagiosum. *J Korean Med Sci*. 2008;23(2):307–14.
91. Tang Y, et al. Expression of Langerhans cell and plasmacytoid dendritic cell markers, and Toll-like receptor 7/9 signaling pathway proteins in verruca vulgaris lesions. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(8):e19214.

92. Futata E, et al. Impaired IFN- $\alpha$  secretion by plasmacytoid dendritic cells induced by TLR9 activation in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol.* 2011;164(6):1271–9.
93. Lund J, et al. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198(3):513–20.
94. Rasmussen SB, et al. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol.* 2007;81(24):13315–24.
95. Hochrein H, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-  $\alpha$  production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(31):11416–21.
96. Zhang SY, et al. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev.* 2007;220(1):225–36.
97. Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32633–42.
98. Castells-Rodellas A, et al. Interleukin-6 in normal skin and psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 1992;72(3):165–8.
99. Mossman KL, Ashkar AA. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol.* 2005;18(2):267–81.
100. Mossman KL, Smiley JR. Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol.* 2002;76(4):1995–8.
101. Ku CC, et al. Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):173–82.

## ANEXOS

## ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação "in situ" do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitóides em pacientes com eritema polimorfo

**Pesquisador:** Valeria Aoki

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 66313817.0.0000.0068

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.024.778

**Apresentação do Projeto:**

A literatura mostra que alterações no recrutamento e/ou no funcionamento das células dendríticas plasmocitóides estão relacionadas à persistência da infecção herpética. Por sua vez, a persistência dessa infecção é um fator causal para o eritema polimorfo. Desta forma, é possível que a menor atividade dessas células poderia se relacionar à resposta inflamatória que resulta nas lesões clínicas de eritema polimorfo. Serão utilizados fragmentos de pele embebidos em parafina, armazenados no Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia HCFMUSP coletados com finalidade diagnóstica assistencial. Serão avaliados os registros de exames sorológicos para herpes simples e exames citológicos dos mesmos indivíduos, por meio de análise retrospectiva dos exames com resultados armazenados no prontuário médico eletrônico no banco de exames informatizados da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. A avaliação dos fragmentos de pele será realizada através de imunistoquímica com anticorpos primários: anti-CD123, anti-CD303, anti-TLR7, anti-TLR9, anti-IL-6 e anti-TNF. Serão estudados dois grupos de doentes: doentes com eritema polimorfo recorrente e doentes com eritema polimorfo de etiologia medicamentosa atendidos entre janeiro de 2000 a dezembro de 2015.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a presença e a atividade das células dendríticas plasmocitóides na inflamação e na

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



Continuação do Parecer: 2.024.778

imunidade inata contra o vírus do herpes simples em pacientes com eritema polimorfo, através da expressão de proteínas relacionadas ao processo inflamatório na pele de pacientes com eritema polimorfo. pacientes com diagnóstico de eritema polimorfo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não riscos envolvidos e não há benefícios a curto prazo para os pacientes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo relevante para elucidar mecanismos fisiopatológicos que estão na base do aparecimento de lesões clínicas de eritema polimorfo. Não há risco para os pacientes envolvidos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O termo de consentimento livre e esclarecido apresentado está adequado e deverá ser redigido em impresso oficial da Instituição.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O protocolo apresenta todas as condições para ser aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853957.pdf	28/03/2017 12:02:21		Aceito
Outros	Alteracao_registro_online.pdf	28/03/2017 12:01:10	Valeria Aoki	Aceito
Outros	Registro_Online_16310.pdf	13/03/2017 09:52:36	Valeria Aoki	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ERITEMA_POLIMORFO.pdf	05/03/2017 18:31:06	Valeria Aoki	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/03/2017	Valeria Aoki	Aceito

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

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.024.778

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	18:29:29	Valeria Aoki	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ERITEMA_POLIMORFO.pdf	05/02/2017 17:02:05	Valeria Aoki	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 20 de Abril de 2017

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
**(Coordenador)**

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

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

---

**DADOS DA PESQUISA**

**Título da pesquisa** - "Avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitóides em pacientes com eritema polimorfo"

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

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

**Duração da Pesquisa:** 30 meses

---

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

**Quais são os objetivos do estudo?**

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

**Quais procedimentos serão realizados?**

Serão avaliados fragmentos de pele que foram previamente obtidos através de biópsia e resultados de exame de sangue previamente coletados com autorização dos pacientes, durante seu acompanhamento habitual no ambulatório de dermatologia. As biópsias foram realizadas após injeção de anestesia, retirada de um fragmento de pele de 4mm de diâmetro, fechamento do local da cirurgia por pontos com fio de Nylon e cobertura com curativo. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa no Laboratório Central do Hospital das Clínicas. Os exames foram feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para os participantes do estudo.

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

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

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

**Quais são os benefícios do estudo?**

Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que visa analisar a causa do eritema polimorfo, e o que acontece na pele para a manifestação da doença. No entanto, o maior conhecimento sobre esta doença pode melhorar a assistência à saúde dos doentes.

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

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

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

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

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

**Há alguma despesa para o participante da pesquisa?**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Caso aceite participar da pesquisa, em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Profª Dra. Valéria Aoki, que pode ser encontrada no endereço. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia CEP: 05403-000, Telefone (11) 2661-6398, e-mail [dermatologia.ichc@hc.fm.usp.br](mailto:dermatologia.ichc@hc.fm.usp.br). Também poderá entrar em contato com a pesquisadora Natasha Favoretto Dias de Oliveira, no mesmo endereço e telefone. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549;  
e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br).

---

**Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Avaliação *in situ* do perfil fenotípico e funcional das células dendríticas plasmocitóides em pacientes com eritema polimorfo”**

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

---

Assinatura do participante /representante legal  
Data / /

---

Assinatura do responsável pelo estudo  
Data / /

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

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

**2. RESPONSÁVEL LEGAL**

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

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_