

IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA NO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO. CONTRIBUIÇÃO PARA SUA PADRONIZAÇÃO

Horacio FRIEDMAN (1), Iphis T. CAMPBELL (1), Rosicler ROCHA ALVAREZ (1), Luis A. DIAZ (2),
Raymundo MARTINS DE CASTRO (3), Isaac ROITMAN (4), Rosa M. PARREIRAS (1) & Alberto N. RAICK (1).

RESUMO

O propósito da presente investigação foi padronizar a reação de imunofluorescência indireta para Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem). Verificamos que a pele humana normal é o substrato ideal e que pode proceder de prepúcio, cabeça, pescoço ou da parede abdominal anterior. A lavagem prévia da pele precedendo a incubação com o soro deve ser evitada pois a antigenicidade pode ser diminuída. O TAS-cálcio preserva as propriedades antigênicas da pele e deve ser preferido como diluente para os soros. Lâminas cobertas com albumina são úteis porque aumentam a aderência dos cortes de pele. A diluição apropriada do conjugado é convenientemente determinada pelo teste de imunodifusão radial (método de Ouchterlony). Com referência à correlação entre título de anticorpos e atividade clínica, concluímos que um título igual ou maior do que 160 era de mau prognóstico pois estava associado à forma generalizada da doença ou à casos de forma localizada refratários à terapêutica usual. Contudo, esta observação requer confirmação através de estudos que envolvam uma abordagem clínica apropriada.

UNITERMOS: Pênfigo foliáceo endêmico; Imunofluorescência indireta.

INTRODUÇÃO

Fogo Selvagem, mais apropriadamente denominado Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE), é forma de pênfigo foliáceo que ocorre com alta incidência e freqüente distribuição familiar na América Latina, particularmente no Brasil^{2, 3, 6, 12, 16, 17, 27, 31} estimando-se atualmente em mais de 15.000 o número de casos¹⁶.

A patogênese do PFE decorreria da ação de um auto-anticorpo cujo alvo é a substância inter-

celular da epiderme⁷. Este anticorpo pertence geralmente à classe IgG e pode ser demonstrado por imunofluorescência direta das lesões cutâneas^{9, 24} ou por imunofluorescência indireta no soro dos pacientes^{9, 10}. Como o auto-anticorpo não é espécie-específico, pode-se utilizar epitélio escamoso de pele ou de mucosa de várias espécies animais para a realização da reação de imunofluorescência indireta, o que permitiu a padro-

(1) Laboratório de Patologia e Serviço de Dermatologia da Fundação Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil.

(2) Immunodermatology Unit, Department of Dermatology, Johns Hopkins Medical Institutions. Baltimore, MD, USA.

(3) Departamento de Dermatologia, Escola Paulista de Medicina. São Paulo, SP, Brasil.

(4) Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Fundação Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Horácio Friedman, Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. CEP 70910. Brasília, DF, Brasil.

nização de métodos semi-quantitativos de titulação de anticorpos¹⁰.

A reação de imunofluorescência indireta para pénfigo é o único parâmetro laboratorial específico e semi-quantitativo de que dispomos, representando ao lado da avaliação clínica um dado importante para a quantificação aproximada da gravidade da doença. Em casos incaracterísticos, ela tem valor diagnóstico, como exame complementar. Vários autores postulam ainda seu valor prognóstico e de orientador terapêutico, permitindo que se regule a dose de medicamento de acordo com o nível sérico de anticorpos^{8, 23}. Finalmente, a reação pode ser utilizada para inquéritos soro-epidemiológicos¹⁵, aspecto ainda carente de abordagem em nosso país, principalmente se considerarmos que os pacientes que procuram o hospital provavelmente correspondem apenas à porção visível do "iceberg" representativo da população atingida pela doença.

A falta de padronização universal da reação e as controvérsias que cercam a correlação entre títulos de anticorpos e gravidade da doença (Ta-

bela 1) motivaram a presente investigação na qual procuramos comparar vários substratos, analisar as variáveis influentes sobre a reação, testar a reprodutibilidade desta e avaliar a correlação clínico-sorológica.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Procedimentos gerais

1. Pacientes e soros

Estudamos pacientes atendidos na Unidade de Dermatologia do Hospital Docente Assistencial de Brasília. O diagnóstico de PFE foi baseado em dados clínicos, exame histopatológico das lesões e imunofluorescência direta das mesmas. A classificação clínica utilizada foi a proposta pelo "grupo cooperativo de pénfigo"¹⁶. Esta classificação aceita duas formas ativas da doença — a localizada e a generalizada. As reações de imunofluorescência direta e os exames histopatológicos foram realizados no Laboratório de Patologia da Fundação Universidade de Brasília (UnB). As reações de imunofluorescência indi-

TABELA 1

Tipos de substratos utilizados em diferentes laboratórios e respectivos estudos sobre a correlação clínico-sorológica.

GRUPO	SUBSTRATO	CORRELAÇÃO
ANHALT et alii, 1982	língua de rato	não estudada
BEUTNER et alii, 1980	esôfago de macaco	positiva
CRESWELL et alii, 1981	pele humana	inconstante
FEIBELMAN et alii, 1981	esôfago de macaco	positiva
FITZPATRICK & NEWCOMER, 1980	esôfago de macaco	inconstante
KATZ et alii, 1969	pele humana	positiva
GOLAN et alii, 1984	lábio de cobaia	inconstante
JUDD & LEVER, 1979	esôfago de cobaia	ausente
JUDD & MESCON, 1979	vários	inconstante
MATIS et alii, no prelo	pele humana	não estudada
RIVITTI, 1972	esôfago de cobaia	inconstante
TAKAHASHI, 1981	esôfago de cobaia	inconstante
WEISSMAN et alii, 1978	pele humana	positiva

Correlação: correlação entre atividade clínica e títulos de anticorpos no soro.

Não estudada: não houve estudo sobre a correlação.

Inconstante: houve correlação positiva em alguns casos apenas.

Positiva: houve correlação positiva na maioria ou na totalidade dos casos.

Ausente: não houve correlação.

reta foram realizadas na UnB e na Immunodermatology Unit da Johns Hopkins University (IDU). A investigação compreendeu três fases — uma preliminar na UnB, uma intermediária na IDU e uma final na UnB. Na UnB, foram titulados 41 soros, sendo 22 de pacientes com doença localizada, dez de pacientes com doença generalizada, um de paciente em fase inativa e oito de parentes de doentes, isto é, de pessoas normais provenientes de áreas endêmicas. Na IDU, titulamos 92 soros, sendo 50 de doentes com forma localizada, 19 de forma generalizada, nove de doentes em fase inativa e 14 soros de pessoas normais de áreas endêmicas. Dos 41 soros testados na UnB, 23 foram também testados na IDU, permitindo as comparações demonstradas nas tabelas 7 e 8.

2. Tampões

Utilizamos a solução salina com tampão fosfato (PBS), em pH 7,2 e o TRIS-acetato cálcio (TAS-cálcio) em pH 7,5, cuja solução-estoque 10x é preparada com 48,40 g de Trisma base (0,01 M) dissolvidas em 3 litros de água destilada. Adiciona-se 340 g de NaCl (0,85%) e titula-se a pH 7,5 com ácido acético. Adiciona-se 22,2 g de cloreto de cálcio e 8 g de azida de sódio. Completa-se o volume a 4 litros, empregando-se diluições a 1:10 com água destilada no momento de usar⁴.

3. Conjugados

Empregamos conjugados obtidos comercialmente da Biolab (na fase preliminar) e da Cappel (na IDU e na fase final). Na fase preliminar, determinamos a diluição de uso através de reações de imunofluorescência direta empregando cortes em criostato de baço humano obtido em necrópsias. Na IDU, a diluição de uso era determinada por imunodifusão radial — método de Ouchterlony — (Fig. 1) que passamos a adotar no Brasil⁴.

4. Substratos

Na fase preliminar, amostras de pele humana obtida por cirurgia plástica de mama, língua de rato, lábio de camundongo, esôfago de cobaia e pele de camundongo recém-nascido eram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Na IDU, onde utilizamos prepúcio de recém-nascidos obtido por circuncisão e na UnB, na

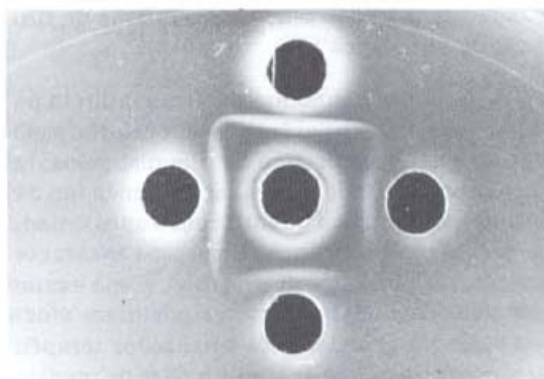


Fig. 1 — Reação de imunodifusão radial (método de Ouchterlony) empregada para definir a diluição ideal de uso do conjugado anti-IgG. O orifício superior, envolto pelo halo mais brilhante, continha conjugado puro, não diluído. O orifício da esquerda continha conjugado diluído a 1:2. No orifício inferior, havia conjugado diluído a 1:4 e no da direita, a 1:8. No orifício central, colocou-se soro humano normal. Diante da presença de linha de precipitação relativamente fraca mas bem evidente em correspondência à diluição 1:8, este conjugado foi empregado na diluição 1:16.

fase final, quando empregamos pele humana de região abdominal obtida por cirurgia de correção de hérnia, as amostras eram colocadas na resina denominada composto OCT, da Miles Laboratories, Inc., orientadas e imersas em nitrogênio líquido, formando-se blocos sólidos que eram armazenados em congelador a -20°C. Em experimentos destinados à comparação de substratos, montávamos num mesmo bloco de OCT os vários espécimes a serem testados.

5. Preparo das lâminas

Na fase preliminar, as lâminas eram simplesmente desengorduradas com banhos de éter e acetona, sendo usadas logo após a secagem. Na IDU e na fase final, empregamos lâminas tratadas com albumina^{4, 35}.

6. Cortes em criostato

Os blocos foram cortados em criostato Leitz na UnB e em criostato da American Optical na IDU. Três cortes de 5 μ m cada eram colocados em cada lâmina.

7. Incubação e lavagem dos cortes

A incubação dos cortes com os soros e com o conjugado foi feita à temperatura ambiente,

em câmara úmida, por 30 minutos. Após as incubações, os cortes eram subinjetados a duas lavagens de 10 minutos cada, também à temperatura ambiente, com PBS ou TAS-cálcio.

8. Montagem das lâminas

Na fase preliminar, montávamos as lâminas com glicerina tamponada, pH 7,2. Na IDU e na fase final, usamos o Permafluor da Lipshaw¹.

9. Leitura, análise e documentação das reações

Procedeu-se o exame das reações de imunofluorescência em microscópios Zeiss, modelo de trans-iluminação (UnB) e da Olympus, modelo de epi-iluminação (IDU). Para as fotografias, empregou-se filmes Kodacolor e TRIS X, ambos de 400 ASA, com exposição média de 2 a 3 minutos. À intensidade da reação, foram conferidos os valores:

0: reação negativa;

1+: reação positiva mas de fraca intensidade, pouco evidente;

2+: reação positiva de moderada intensidade, bem evidente;

3+: reação positiva de forte intensidade.

Foi considerada significativa diferença de duas ou mais diluições no resultado da titulação.

10. Esquemas gerais das reações

No decorrer do trabalho e com o evoluir do método, empregamos os esquemas de reação descritos a seguir.

Esquema I (empregado no início da fase preliminar na UnB)

cortes (vários substratos) → acetona → PBS
→ soro → PBS → conjugado → PBS
→ montagem.

Esquema II (empregado no fim da fase preliminar na UnB)

cortes (língua de rato) → soro → PBS →
conjugado → PBS → montagem.

Esquema III (empregado na IDU)

cortes (pele humana de prepúcio de recém nascido) → soro diluído em TAS-cálcio → TAS cálcio → conjugado → TAS-cálcio → montagem.

Esquema IV (empregado na fase final)

cortes (pele humana de abdômen) → soro diluído em TAS-cálcio → TAS-cálcio → conjugado → PBS → montagem.

Um soro positivo de paciente com PFE e um soro negativo de pessoa normal serviram de controles.

B. Procedimentos Específicos

Estes experimentos estudaram a influência de algumas variáveis sobre as reações. Assim, comparamos vários substratos e analisamos os efeitos da acetona, do composto OCT, da lavagem prévia com PBS, do congelamento rápido ou lento dos substratos e do armazenamento das lâminas. Para o composto OCT, titulamos 4 soros empregando substratos (língua de rato e esfago de cobaia) embebidos ou não no mencionado composto. Na avaliação do efeito da velocidade de congelamento, titulamos 7 soros utilizando língua de rato congelada rapidamente com nitrogênio líquido ou lentamente dentro do criostato. O efeito do armazenamento das lâminas com cortes foi analisado ao se titular 4 soros empregando cortes preparados no mesmo dia versus cortes preparados 7 dias antes.

RESULTADOS

Ao compararmos os vários substratos, levamos em consideração os títulos obtidos, a clareza da reação, a facilidade para a obtenção do espécime e a qualidade dos cortes em criostato. Diante deste conjunto de dados, a língua de rato despontou como um substrato satisfatório em nossos experimentos preliminares (Tabelas 2, 3 e 4). Na IDU e na fase final, a pele humana foi considerada o substrato ideal.

Com o emprego da acetona (comparar Tabelas 3 e 4) e da lavagem prévia com PBS (Tabelas 5 e 6), as reações apresentaram pior qualidade e títulos mais baixos.

FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; ALVAREZ, R. R.; DIAZ, L. A.; CASTRO, R. M. de; ROITMAN, I.; PARREIRAS, R. M. & RAICK, A. N. — Imunofluorescência indireta no pêngigo foliáceo endêmico. Contribuição para sua padronização. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 31(3): 158-168, 1989.

TABELA 2
Comparação entre diferentes substratos

Soro N°	TÍTULOS			
	Li	La	Ec	Ph
221	40	40	40	0
220	0	0	0	0
219	40	80	40	0
218	80	40	0	1.280
217	320	320	320	160
212	640	320	80	320
139	0	80	0	0
127	320	320	0	320

Foi empregado o esquema I de reação (descrito no item IV.A).

Li: língua de rato.

La: lábio de camundongo.

Ec: esôfago de cobaia.

Ph: pele humana.

TABELA 3
Comparação entre diferentes substratos

Soro N°	TÍTULOS				
	Li	La	Ec	Pr	Pc
224	160	20	0	20	20
223	0	0	0	0	0
171	20	20	0	0	0
129	80	80	0	80	80
92	160	320	80	1.280	160
75	160	160	160	160	80

Foi empregado o esquema I de reação (descrito no item IV.A).

Li: língua de rato.

La: lábio de camundongo.

Ec: esôfago de cobaia.

Pr: pele de rato.

Pc: pele de camundongo.

TABELA 4
Comparação entre diferentes substratos

Soro N°	TÍTULOS				
	Li	La	Ec	Pr	Pc
224	320	160	320	320	160
223	160	80	160	320	40
198	160	40	20	40	n/e
193	80	40	0	20	n/e
172	20	40	20	40	n/e
171	0	20	0	0	20
129	640	320	160	320	320
109	40	80	0	80	n/e
92	1.280	1.280	1.280	1.280	1.280
75	80	40	0	80	40
64	0	0	0	0	0
61	80	20	20	80	20

Nestas reações, foi abolida a fixação com acetona.

Li: língua de rato.

La: lábio de camundongo.

Ec: esôfago de cobaia.

Pr: pele de rato.

Pc: pele de camundongo.

n/e: não examinado.

TABELA 5
Efeito da lavagem prévia com PBS

Soro N°	INTENSIDADE DA REAÇÃO*		
	S/PBS	PBS-9 min	PBS-30 min
241	3+	2+	1+
238	3+	1+	2+
236	2/3+	2+	1+
235	3+	2+	0
234	3+	1+	1+
233	3+	2+	1+
232	3+	2+	1+
231	2/3+	2+	0
229	2/3+	2+	1+

* Avaliou-se a intensidade da reação numa única diluição de soro (1/20).

s/PBS: a lavagem prévia com PBS foi abolida.

PBS-9 min: os cortes foram submetidos a 3 lavagens prévias de 3 minutos cada, precedendo a incubação com os soros.

PBS-30 min: os cortes foram submetidos a 3 lavagens prévias de 10 minutos cada, precedendo a incubação com os soros.

0: reação negativa.

1+: reação positiva de fraca intensidade, pouco evidente.

2+: reação positiva de moderada intensidade, bem evidente.

3+: reação positiva de forte intensidade.

TABELA 6
Efeito da lavagem prévia com PBS.

Soro N°	TÍTULOS	
	s/PBS	c/PBS
257	320	80
252	80	40
250	40	0
248	640	160
241	2.560	40
238	2.560	5.120
236	160	0
234	0	0
233	320	20
231	1.280	0

s/PBS: a lavagem prévia com PBS foi abolida.

c/PBS: os cortes foram submetidos a 3 lavagens com PBS, de 10 minutos cada, antes da incubação com os soros.

Não houve variação na qualidade ou no título das reações em decorrência da utilização do composto OCT, do congelamento lento ou do armazenamento das lâminas.

As reações realizadas na IDU se caracterizaram por excelente contraste imunológico, tornando a leitura fácil e indubitável (Figura 2). Os resultados estão resumidos nas figuras 3 a 7, mostrando que 13 das 14 pessoas normais (91,85%) e oito dos nove pacientes em fase inativa (88,88%) apresentaram reação negativa. Os

50 soros de doentes com forma localizada exibiram títulos variando de 40 a 1.280. Os dois casos com título 40 e 14 dos 16 casos com título 80 mostraram poucas lesões (menos de 10) e necessitaram de doses diárias de manutenção menores do que 20 mg de prednisona. Quatro dos sete pacientes com título 160 recebiam 60 mg de prednisona por dia na data da colheita do soro. Outro paciente desenvolveu forma generalizada em dois meses. Os 13 pacientes com forma localizada e título 320 exibiam 20 ou mais lesões e atividade maior das lesões (eritema acentuado, exsudato etc.). Dois deles evoluíram para forma generalizada. Em seis, houve tendência a recidivas e o controle terapêutico foi difícil mesmo com doses diárias de 20 a 40 mg de prednisona. Esta mesma resistência ao tratamento caracterizou os pacientes com forma localizada e título 640, dois dos quais desenvolveram forma generalizada. A doente com título 1.280 classificada clinicamente como portadora de forma localizada apresentava síndrome de Cushing iatrogênica mantida que estava sob a dose de 40 mg de prednisona por dia. Entre várias recidivas, esta paciente chegou a desenvolver forma generalizada. Dentre os 19 casos com forma generalizada, dois (10,5%) apresentaram título 160, sete (36,8%) mostraram título 320, dois casos (10,5%) exibiram título 1.280, um caso (5,3%) teve título 2.560 e dois casos (10,5%) apresentaram título 5.120. Títulos entre 160 e 1.280 corresponderam a formas generalizadas de aspecto variável, tanto no que tange à extensão da área envolvida, como em relação à intensidade de atividade das lesões e ao tipo destas, isto é, se bolhosas, erodidas, exfoliativas etc. Os quadros generalizados com acometimento de mais de 90% da superfície corpórea mostraram títulos maiores ou iguais a 1.280. Nos dois casos com título 5.120, o acometimento foi total e do tipo eritrodérmico.

As reações realizadas na fase final na UnB apresentaram qualidade e títulos comparáveis aos da IDU (Tabela 8). O esôfago de cobaia não forneceu nunca resultados superiores à pele humana. Propiciou, porém, valores significativamente inferiores (duas ou mais diluições de diferença) em cinco dos casos testados (Tabela 8).

DISCUSSÃO

Um dos mais controversos aspectos relacionados à reação de imunofluorescência indireta

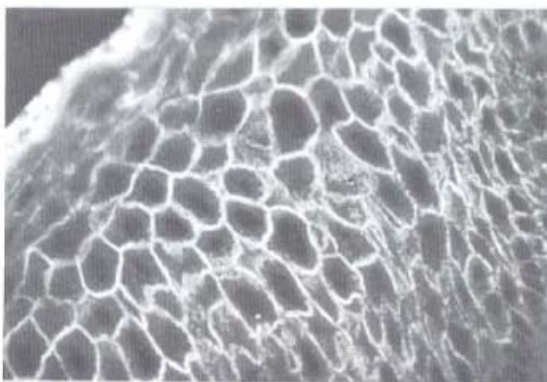
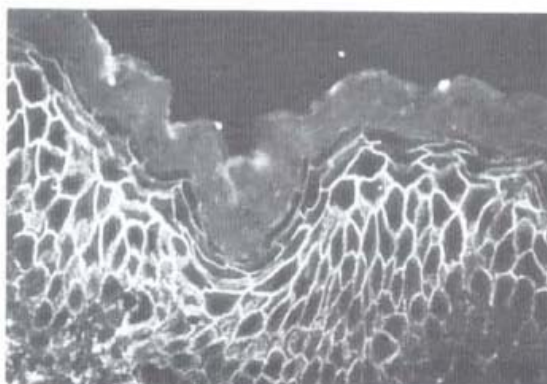
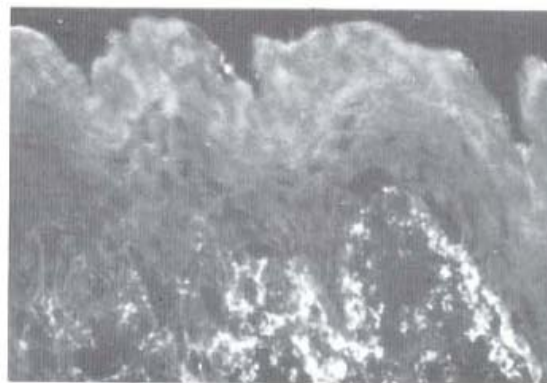


Fig. 2 — Reações de imunofluorescência indireta empregando pele humana normal como substrato e os procedimentos mencionados no texto. A figura 2a corresponde a uma reação negativa, controle, em que se utilizou soro de pessoa normal. As figuras 2b e 2c são de reações positivas, obtidas com soros de doentes de PFE, nas quais é nítida a distribuição intercelular da IgG. x 320 (figuras 2a e 2b); x 400 (figura 2c).

para pêñigo é a escolha do substrato ideal, tema discutido por vários autores^{1, 8, 13, 18, 21, 22, 25, 30}. O esôfago de macaco é recomendado por vários autores^{8, 18}. Não obstante, segundo SABOLINSKI et al.³⁰, o esôfago de cobaia fornece títulos mais elevados do que o esôfago de macaco em

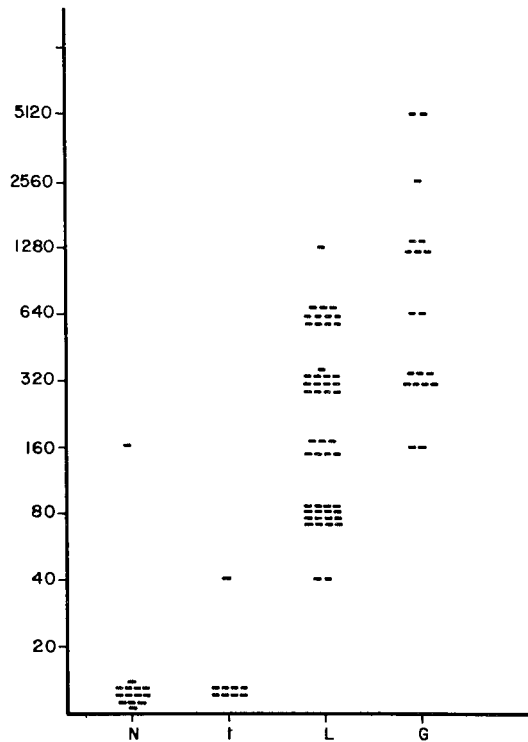


Fig. 3 — Distribuição de títulos de anticorpos por atividade clínica de PFE. N: pessoas normais, sadias; I: pacientes de PFE em inatividade clínica; L: pacientes com a forma localizada de PFE; G: pacientes com a forma generalizada de PFE.

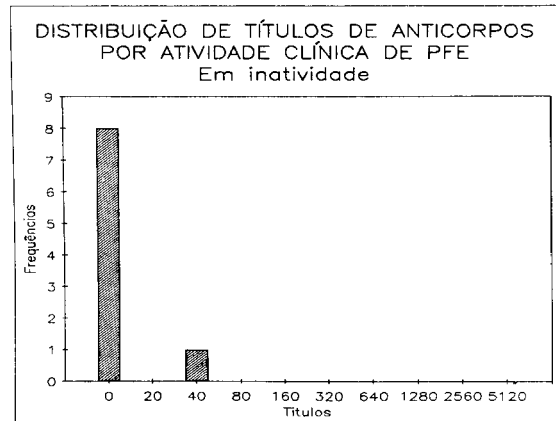


Fig. 4 — Histograma representativo da distribuição dos títulos de anticorpos em soros de pessoas sadias.

casos de PFE, o inverso sucedendo no pêngigo vulgar. Assim, no Brasil, o esôfago de macaco não seria o substrato ideal. Outros trabalhos recentes mencionam inferioridade do esôfago de macaco em relação à pele humana tanto em ca-

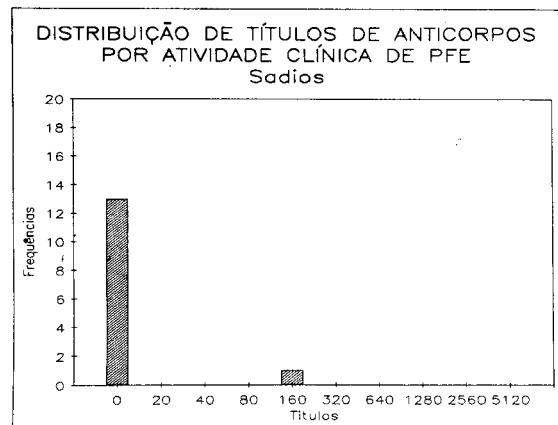


Fig. 5 — Histograma representativo da distribuição dos títulos de anticorpos em soros de pacientes em inatividade clínica.

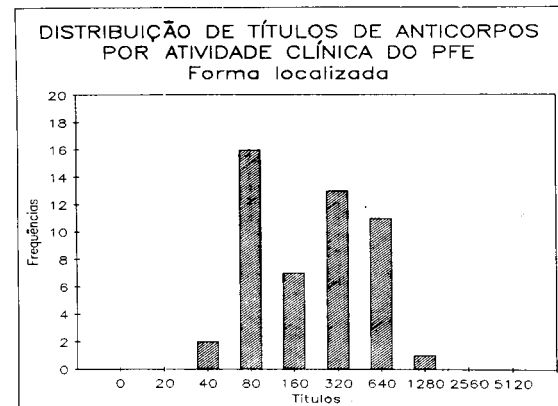


Fig. 6 — Histograma representativo da distribuição dos títulos de anticorpos em soros de pacientes com forma localizada de PFE.

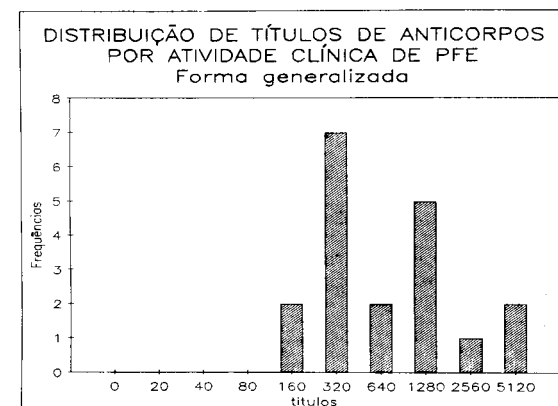


Fig. 7 — Histograma representativo da distribuição dos títulos de anticorpos em soros de pacientes com forma generalizada de PFE.

TABELA 7

Comparação entre títulos obtidos na UnB, no final da fase preliminar e na IDU.

Soro N°	TITULOS	
	UnB	IDU
254	20	40
250	160	320
248	2 560	1 280
245	0	0
244	1 280	640
243	160	80
241	2 560	5 120
239	0	0
238	160	640
236	160	160
233	160	640
232	2 560	1 280
231	1 280	1 280
229	160	160

IDU: Immunodermatology Unit, Johns Hopkins University.

UnB: Universidade de Brasília.

Na UnB, empregávamos nesta fase, língua de rato, soros diluídos em PBS e conjugado da Biolab diluído a 1:20.

Na IDU, empregamos pele humana, soros diluídos em TAS Cálcio e conjugado da Cappel geralmente diluído a 1:32.

TABELA 8

Comparação entre títulos obtidos na IDU e na UnB, na fase final.

Soro N°	TITULOS			IDU Ph
	Ph	UnB		
		Ph	Ec	
254	40	0	0	40
250	640	80	80	320
248	1 280	640	640	1 280
243	80	40	40	80
240	640	320	320	320
221	320	160	160	320
218	640	160	160	640
217	160	80	80	40
213	160	40	40	320
212	160	80	80	320

IDU: Immunodermatology Unit, Johns Hopkins University.

UnB: Universidade de Brasília.

Ph: pele humana.

Ec: esôfago de cobaia.

sos de PFE como de pénfigo vulgar^{1, 25}. As crescentes restrições ao uso de primatas em pesquisa estão limitando a utilização do esôfago de macaco nos Estados Unidos²⁶ e no Brasil o alto preço e as dificuldades para a obtenção do esôfago de macaco inviabilizam o seu emprego rotineiro. Este conjunto de motivos justifica a não inclusão

deste substrato na presente investigação. Outro órgão frequentemente utilizado é o esôfago de cobaia^{21, 28, 33}. Recentemente elevado à condição de substrato ideal para casos de PFE³⁰, o esôfago de cobaia forneceu em nossos experimentos reações menos intensas e títulos mais baixos do que a pele humana. Já a língua de rato, de fácil obtenção, foi o substrato que melhor nos impressionou na fase de estudos preliminares. Empregado pelo grupo de IDU no passado^{2, 29}, a língua de rato mostrou em nosso estudo resultados com satisfatória superposição aos obtidos com pele humana (Tabela 7). Porém, com o emprego da língua de rato, tanto em nossa casuística como na do grupo da IDU²⁹, foram observados soros de pessoas normais com reações positivas. Inicialmente, estes resultados foram considerados como corroborando os achados de CASTRO et al.¹¹ de que soros positivos podem ser encontrados no seio da população aparentemente sadia de áreas endêmicas de PFE. Contudo, o emprego da pele humana nos moldes preconizados pelo grupo da IDU tem fornecido constantemente reações negativas em pessoas normais¹⁷. Um único caso de nossa soroteca que foi positivo nestas circunstâncias apresenta forte suspeita de troca e nova reação recentemente realizada com soro desta pessoa foi negativa. É possível ainda que reações aparentemente falso positivas encontradas em pessoas normais provenientes de áreas endêmicas decorram da presença de anticorpos que reajam contra uma citoqueratina murina recentemente descrita e denominada antígenos Cascas¹⁶. Três de nossos soros positivos na reação de imunofluorescência indireta com língua de rato e negativos com pele humana (soros 172, 174, 176), pertencentes a pessoas saudias, parentes de doentes com PFE, foram positivos aos antígenos Cascas em testes realizados na IDU. Este conjunto de dados é pois favorável ao emprego da pele humana que tem oferecido resultados excelentes quando utilizada em associação aos demais procedimentos discutidos adiante. O prepúcio de recém-nascido, a pele da cabeça e do pescoço²⁰ e, conforme verificamos no presente estudo, a pele da parede abdominal anterior prestam-se bem à execução da reação. Como SISON-FONACIER & BYSTRYN³² demonstraram variações topográficas na distribuição de antígenos de pénfigo no corpo humano, é recomendado cuidado na escolha do local de origem da pele a ser utilizada como substrato.

Com relação às variáveis potencialmente influentes sobre a reação, verificamos que o com posto OCT não a prejudicou e que seu emprego permitiu melhor orientação do substrato na constituição do bloco, facilitando desta forma a realização dos cortes em criostato.

Já a utilização da acetona teve efeito deletério que interpretamos agora como parcialmente decorrente das lavagens subseqüentes em PBS, precedendo a incubação com os soros. De acordo com OGAWA et al.²⁶, estas lavagens diminuem a reatividade dos antígenos de pénfigo, fato confirmado por MATIS et al.²⁵ e por nossos experimentos (Tabelas 5 e 6).

A questão de preservação antigênica foi ainda considerada nos testes de congelamento rápido e lento e de armazenamento das lâminas. É curioso que os antígenos aparentemente se conservam bem tanto diante do congelamento lento como em face do armazenamento. O sucesso com o emprego de pele obtida em necrópsias²³ demonstra, aliás, a resistência do sistema antigênico do pénfigo frente à autólise. Do ponto de vista prático, estas características são úteis por dispensarem o uso do nitrogênio líquido e por permitirem o armazenamento de substratos ou dos cortes já em lâminas, pelo menos por determinado período de tempo (uma semana em nossos experimentos). É evidente contudo, que condições ótimas, como a do emprego do nitrogênio líquido e dos cortes ainda frescos, preparados no mesmo dia ou nos dias imediatamente anteriores, proporcionam menos riscos de insucesso devendo ser sempre preferidas.

O emprego adequado do conjugado representa indubitavelmente ponto básico na realização das reações de imunofluorescência¹³. O método de imunodifusão radial⁴ para a titulação do conjugado é econômico, seguro, de reprodução fácil e de execução rápida.

As reações realizadas na IDU apresentaram excelente qualidade e contraste imunológico suficientemente claro para evitar dúvidas à leitura (Figura 2).

Nossos testes na etapa final, na UnB, empregando o esquema IV, demonstraram a reprodutibilidade da reação e asseguraram-nos o seu do

mínio. Verificamos ainda que a pele humana é superior ao esôfago de cobaia.

Com relação aos títulos obtidos, é importante ressaltar que nenhum paciente em atividade clínica apresentou reação negativa. Esta caracterizou pessoas sadias e doentes em inatividade. Há suspeita de troca de soro para a pessoa sadia que exibiu reação positiva.

A correlação, nos 92 casos testados na IDU, entre a atividade clínica e o título de anticorpos séricos (Figuras 3 a 7) sugere à primeira vista associação de tipo grupal mas não individual, isto é, a média dos títulos foi maior para a forma generalizada (média = 460,8) do que para a forma localizada (média = 299,2), mas alguns casos de forma localizada tiveram títulos mais elevados do que casos de forma generalizada. Isto confirmaria resultados de outros autores^{28, 33} e reforçaria o conceito de alguns de que o emprego do título de anticorpos como parâmetro de atividade clínica e como orientador terapêutico não se justifica²¹. Contudo, observação mais minuciosa dos prontuários dos pacientes revelou que os grupos forma localizada e forma generalizada não são na realidade clinicamente homogêneos, havendo considerável variação de grau de atividade clínica intra-grupal. Ainda, alguns pacientes são mantidos na forma localizada à custa de tratamento prolongado com doses de manutenção relativamente elevadas de imunodepressores (20 mg ou mais de prednisona por dia). Estes pacientes com forma localizada mas com evolução clínica marcada por recidivas e resistência à terapêutica habitual seriam talvez melhor classificados como "high responders" no conceito de DIAZ et al.¹⁷ no sentido de que respondem intensamente ao agente desencadeante do PFE, com títulos elevados de anticorpos.

Analisando individualmente título e comportamento clínico, observamos que o título 160 parece representar marco de mau prognóstico por ser o limite inferior dos títulos encontrados na forma generalizada e por compreender pacientes com forma localizada de difícil controle. Títulos acima de 160 pertenceram a pacientes com forma generalizada ou com forma localizada resistente à terapêutica. Acreditamos porém que tal observação só será confirmada ou infirmada através de futuras investigações clínico-

sorológicas que, contando já com reação devidamente padronizada, possam esmiuçar as formas clínicas atualmente reconhecidas de PFE, talvez subdividindo-as em grupos e enfocando as de modo quantitativo, através de fórmulas que considerem o número de lesões ou a área corpórea comprometida, o tipo e a atividade da lesão e as doses empregadas.

SUMMARY

Indirect immunofluorescent reaction in endemic pemphigus foliaceus.

The aim of the present research was to standardize the indirect immunofluorescence reaction for Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). We found that fresh human skin was the ideal substrate and could proceed from foreskin, head, neck, or anterior abdominal wall. PBS pre-washing of the skin preceding the incubation with the serum should be avoided since the antigenicity might be diminished. TAS calcium preserves the Pemphigus antigenic properties of the skin and shall be preferred as the diluent for the sera. Albumin-coated slides are useful because they increase the adherence of the skin sections. The conjugate appropriate dilution is conveniently determined by the radial immunodiffusion test (Ouchterlony method). So far as the correlation between the antibody titer and the clinical activity is concerned, we concluded that a titer of 160 or more was of bad prognosis, since it was associated with the generalized form of the disease or with cases of the localized form refractory to the usual therapy. Nevertheless, this assumption needs confirmation by further studies involving an appropriate clinical approach.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxílio técnico de Paula Bonitz, Gerardine M. M. Finn, Pedro B. Araújo e Bráulio S. Santos Filho e a assistência fotográfica de Paulo H. B. Leite. Esta pesquisa foi em parte amparada financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (projeto 40.6319/84) e pelo Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Fundação Universidade de Brasília (projeto 54025).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACOSTA, E. & IVANYL, L. — Comparison of the reactivity of various epithelial substrates for the titration of Pemphigus antibodies by indirect immunofluorescence. *Brit. J. Derm.*, 107: 537-541, 1982.
2. AHMED, A. R. — Clinical features of Pemphigus. *Clin. Derm.*, 1: 13-21, 1983.
3. AHMED, A. R.; GRAHAM, J.; JORDON, R. E. & PROVOST, T. T. — Pemphigus current concepts. *Ann. intern. Med.*, 92: 396-405, 1980.
4. ANHALT, G. J.; DIAZ, L. A.; LABIB, R. S. & PROVOST, T. T. — *Procedures Manual*. Baltimore, Dermatology Unit, Johns Hopkins Medical Institutions, 1987.
5. ANHALT, G. J.; LABIB, R. S.; VOORHEES, J. J.; BEALS, T. F. & DIAZ, L. A. — Induction of Pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *New Engl. J. Med.*, 306: 1189-1196, 1982.
6. AUAD, A. — Pénfigo foliáceo sul americano no estado de Goiás. *Rev. Pat. trop.*, 1: 293-346, 1972.
7. AVALOS, E.; PATEL, H. P.; ANHALT, G. J. & DIAZ, L. A. — Autoimmune injury of squamous epithelium by Pemphigus autoantibodies. *Brit. J. Derm.*, 111: 359-365, 1984.
8. BEUTNER, E. H.; JABLONSKA, S.; CHORZELSKI, T. P. & NISENGARD, R. J. — Reliability of indirect immunofluorescence testing. *Arch. Derm.*, 116: 1228-1229, 1980.
9. BEUTNER, E. H.; JORDON, R. E. & CHORZELSKI, T. P. — The immunopathology of Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *J. invest. Derm.*, 51: 63-80, 1968.
10. BEUTNER, E. H.; LEVER, W. F.; WITBESKY, E.; JORDON, R. E. & CHERTOCK, B. — Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: response to an intercellular substance of epidermis. *J. Amer. med. Ass.*, 192: 682, 1965.
11. CASTRO, R. M.; CHORZELSKI, T.; JABLONSKA, S. & MARQUART JR., A. — Antiepithelial antibodies in healthy people living in an endemic area of South American Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). Preliminary report. *Castellania*, 4: 111-112, 1976.
12. CASTRO, R. M.; ROSCOE, J. T. & SAMPAIO, S. A. P. — Brazilian Pemphigus Foliaceus. *Clin. Derm.*, 1: 22-41, 1983.
13. CHORZELSKI, T. P. & BEUTNER, E. H. — Factors contributing to occasional failures in demonstration of Pemphigus antibodies by the immunofluorescence test. *J. invest. Derm.*, 53: 188-191, 1969.
14. CRESWELL, S. N.; BLACK, M. M.; BHOGAL, B. & SKEETE, M. V. H. — Correlation of circulating intercellular antibody titres in Pemphigus with disease activity. *Clin. exp. Derm.*, 6: 477-483, 1981.
15. CUNHA, P. R. — *Estudo soro-epidemiológico em foco de pénfigo foliáceo endêmico (Fogo selvagem) no Estado de São Paulo*. São Paulo, 1988. (Tese de Doutorado — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

16. DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; BORGES, P.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; LABIB, R. S. & ANHALT, G. J. — I. Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo selvagem). *J. Amer. Acad. Derm.*, 1988. (in press).
17. DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; BORGES, P.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; LABIB, R. S. & ANHALT, G. J. — Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J. invest. Derm.*, 1988 (in press).
18. FEIBELMAN, C.; STOLZNER, G. & PROVOST, T. T. — Superior sensitivity of monkey esophagus in the determination of Pemphigus antibody. *Arch. Derm.*, 117: 561-563, 1981.
19. FITZPATRICK, R. E. & NEWCOMER, V. D. — The correlation of disease activity and antibody titers in Pemphigus. *Arch. Derm.*, 116: 285-290, 1980.
20. GOLAN, D.; GUILHAR, A.; SHMUEL, Z. & MOSHKOWITZ, M. — Autoantibodies to epithelial cells (intercellular substance) and their correlation with clinical activity of Pemphigus Vulgaris. *Dermatologica (Basel)*, 169: 339-341, 1984.
21. JUDD, K. P. & LEVER, W. F. — Correlation of antibodies in skin and serum with disease severity in Pemphigus. *Arch. Derm.*, 115: 428-432, 1979.
22. JUDD, K. P. & MESCON, H. — Comparison of different epithelial substrates useful for indirect immunofluorescence testing of sera from patients with active Pemphigus. *J. invest. Derm.*, 72: 314-316, 1979.
23. KATZ, S. I.; HALPRIN, K. M. & INDERBITZIN, T. M. — The use of human skin for the detection of anti-epithelial auto-antibodies. A diagnostic and prognostic test. *J. invest. Derm.*, 53: 390-399, 1969.
24. LEVER, W. F. & SCHAUMBURG LEVER, G. — *Histopathology of the skin*, 6th ed. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1983.
25. MATIS, W. L.; ANHALT, G. J.; DIAZ, L. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R. & BERGER, R. S. — Calcium enhances the sensitivity of immunofluorescence for Pemphigus antibodies. *J. invest. Derm.*, 88: 302-304, 1987.
26. OGAWA, H.; TANEDA, A. & MORIOKA, S. — Characterization of Pemphigus antigen. *J. invest. Derm.*, 70: 194-196, 1978.
27. PROENÇA, N. & CASTRO, R. M. — Pénfigo foliáceo sul-americano. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 26: 115-122, 1971.
28. RIVITTI, E. A. — *Eletroforese, imunoeletroforese, antitreptolisina O e anticorpos anti-epitélio no pénfigo foliáceo sul-americano. Estudo evolutivo*. São Paulo, 1972 (Tese de doutoramento — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
29. ROSCOE, J. T.; NAYLOR, P. H.; DIAZ, L. A.; LABIB, R. S.; PATEL, H. P.; GOLDSTEIN, A. L.; SAMPAIO, S. A. P. & ANHALT, G. J. — Elevated thymosin alpha 1 levels in Brazilian Pemphigus Foliaceus. *Brit. J. Derm.*, 115: 147-150, 1986.
30. SABOLINSKI, M. L.; BEUTNER, E. H.; KRASNY, S.; KUMAR, V.; HUANG, J.; CHORZELSKI, T. P.; SAMPAIO, S. A. P. & BYSTRYN, J. C. — Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig esophagus sections. *J. invest. Derm.*, 88: 545-549, 1987.
31. SEVADJIAN, C. — Nosology of Brazilian Pemphigus Foliaceus. *Int. J. Derm.*, 18: 781-786, 1979.
32. SISON-FONACIER, L. & BYSTRYN, J. C. — Regional variations in antigenic properties of skin. *J. exp. Med.*, 164: 2125-2130, 1986.
33. TAKAHASHI, M. D. F. — *Imunopatologia do pénfigo foliáceo sul-americano. Estudo por imunofluorescência direta e indireta*. São Paulo, 1981. (Dissertação de mestrado — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
34. WEISSMAN, V.; FEUERMAN, E. J.; JOSHUA, H. & HAZA, B. — The correlation between the antibody titers in sera of patients with Pemphigus Vulgaris and their clinical state. *J. invest. Derm.*, 71: 107-109, 1978.
35. WENK, P. A. — *Pre-coated slides can save time and headaches for histotechs*. Detroit, Lab Tips from Lipshaw, 1986.

Recebido para publicação em 16/9/1988.