

# Imunofluorescência direta no diagnóstico de casos suspeitos de penfigóide cicatricial ocular

*Direct immunofluorescence investigation in patients with clinical suspicion of ocular cicatricial pemphigoid*

Waleska Belmino Chaves Donato<sup>1</sup>

Myrna Serapião dos Santos<sup>2</sup>

Namir Santos<sup>2</sup>

Luciene Barbosa de Souza<sup>3</sup>

Moacyr Pezati Rigueiro<sup>4</sup>

José Álvaro Pereira Gomes<sup>5</sup>

## RESUMO

**Objetivos:** O objetivo deste estudo é caracterizar por meio do exame oftalmológico os pacientes com suspeita clínica de penfigóide cicatricial ocular e apresentar os resultados obtidos com a técnica de imunofluorescência direta. **Métodos:** Estudo prospectivo realizado no setor de Córnea e Doenças Externas da Universidade Federal de São Paulo. Foram examinados 18 pacientes com suspeita clínica de penfigóide cicatricial ocular e realizadas biópsias de conjuntiva para o processamento da imunofluorescência direta em 13 pacientes (26 olhos), que não estavam na vigência de imunossupressão sistêmica ou terapêutica antiglaucomatosa tópica. **Resultados:** Segundo o estadiamento de Foster, a proporção de olhos classificados de I a IV foram: 3,8%, 3,8%, 77%, 15,4% respectivamente. Apenas 3 (23%) pacientes apresentaram imunofluorescência direta positiva. **Conclusão:** A maioria dos pacientes encontravam-se em estágio avançado da doença, o que denota retardo no diagnóstico. A imunofluorescência direta apresentou baixa sensibilidade em detectar depósitos de imunocomplexos na membrana basal da conjuntiva, quando comparada aos dados da literatura.

**Descritores:** Penfigóide mucomembranoso benigno/diagnóstico; Dermatopatias vesiculobolhosas/diagnóstico; Membrana basal; Conjuntiva/patologia; Técnica direta de fluorescência para anticorpo

## INTRODUÇÃO

Penfigóide cicatricial é uma doença sistêmica auto-imune e rara, caracterizada por depósitos de imunoglobulinas e complemento na membrana basal da pele e mucosas, como esôfago, traquéia, ânus e conjuntiva. Há ativação do complemento e infiltração do tecido por neutrófilos, macrófagos e linfócitos T ativados, traduzindo-se clinicamente por hiperemia, bolhas, sinais flogísticos, cicatrização excessiva e progressiva desses tecidos<sup>(1)</sup>.

Dos pacientes com doenças oculares a incidência do penfigóide cicatricial é estimada em 1:12.000 a 1:60.000 dos casos, sem predileção por raça ou distribuição geográfica. Acomete com maior frequência mulheres acima dos 60 anos<sup>(2-3)</sup>.

A manifestação ocular ocorre em aproximadamente 70% dos pacientes com acometimento sistêmico, sendo denominado de penfigóide cicatricial ocular (PCO)<sup>(3)</sup>. Apresenta-se como conjuntivite cicatricial crônica, fibrose sub-epitelial progressiva, encurtamento do fundo de saco inferior (FSI), simbléfaro, anquilobléfaro, triquíase, obstrução das glândulas de Meibomius e do ducto da glândula lacrimal, resultando em ceratoconjuntivite sicca, queratinização da superfície ocular e baixa da acuidade visual<sup>(2-5)</sup>.

<sup>1</sup> Pós-graduando, nível mestrado / Setor de doenças externas e córnea da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

<sup>2</sup> Pós-graduando, nível doutorado / Setor de doenças externas e córnea da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

<sup>3</sup> Doutor em oftalmologia / Chefe do setor de doenças externas e córnea da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

<sup>4</sup> Docente do setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

<sup>5</sup> Doutor em oftalmologia / Setor de doenças externas e córnea da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

**Endereço para correspondência:** Rua Hélio Pradines, 225/701 - Maceió (AL) CEP 57035-220.  
E-mail: Wal\_bcd@hotmail.com

Recebido para publicação em 26.07.2001

Aceito para publicação em 22.07.2002

Devido à gravidade da afecção ocular com possível evolução para cegueira, o diagnóstico deve ser feito precocemente para que a terapêutica seja instituída o mais breve possível. Com isso, pode-se controlar o quadro cicatricial e aumentar o período de remissão da doença, minimizando as seqüelas<sup>(6-7)</sup>.

O diagnóstico do PCO é feito por meio da avaliação oftalmológica, auxiliada por testes laboratoriais que detectam a presença de complexos imunoreagentes na membrana basal da conjuntiva. A imunofluorescência é a técnica mais utilizada devido ao baixo custo e a maior facilidade de execução. A imunoperoxidase, quando comparada a imunofluorescência direta, se mostra mais sensível por conseguir detectar complexos imunoreagentes na membrana basal, mesmo quando em menor número, todavia ambas são inespecíficas<sup>(6,8)</sup>. A microscopia imunoeletrônica surge como um método, de alta sensibilidade e especificidade, associa a técnica de imunoperoxidase à microscopia eletrônica.

O objetivo deste estudo prospectivo é caracterizar clinicamente os pacientes com suspeita clínica de PCO e apresentar os resultados obtidos com a técnica de imunofluorescência direta.

---

## MÉTODOS

---

Foram avaliados prospectivamente, no Setor de córnea e doenças externas do Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo, dezoito (18) pacientes com quadro de conjuntivite cicatricial com suspeita clínica de penfigóide cicatricial ocular (PCO). O diagnóstico clínico de PCO foi confirmado por no mínimo três médicos do setor. Foram excluídos do estudo os pacientes com outras causas de conjuntivite cicatricial, como tracoma, conjuntivite alérgica, queimaduras, quadros cicatriciais associados ao uso de medicação tópica ou sistêmica, e qualquer relato do uso prévio ou atual de terapêutica sistêmica com imunossuppressores ou diaminodifenilsulfona (dapsona). Desses 18 pacientes com suspeita clínica de PCO, foram incluídos no estudo 13 casos, pois 3 já faziam uso de dapsona oral e 2 apresentavam glaucoma crônico e estavam em uso de drogas antiglaucomatosas.

O estadiamento clínico de cada olho foi realizado na admissão do paciente no setor, segundo a classificação de Foster<sup>(8-9)</sup> para penfigóide cicatricial ocular: Estágio I – conjuntivite crônica com fibrose sub-epitelial; Estágio II – encurtamento do fundo do saco inferior em qualquer nível, mas sem simbléfaro; Estágio III – presença de simbléfaro, ceratopatia, neovascularização de córnea, triquiase, distiquiase e alteração do filme lacrimal; Estágio IV – anquilobléfaro, queratinização da superfície ocular e perda da motilidade ocular extrínseca (“olho congelado”).

A acuidade visual (AV) foi medida e classificada de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) em: deficiência visual (AV maior que 6/18 e menor que 6/60), deficiência visual severa (AV entre 6/60 e 6/120) e cegueira (AV maior que 6/120)<sup>(1)</sup>. Também foram pesquisadas clinicamente doenças sistêmicas associadas.

As biópsias da conjuntiva bulbar foram realizadas em 13 pacientes (26 olhos) após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, da seguinte forma: após injeção subconjuntival de lidocaína 2%, um fragmento, medindo 2,0 x 2,0 mm da área hiperemiada da conjuntiva bulbar, foi cuidadosamente dissecado com tesoura de Vannas e pinça de dissecação. O fragmento foi envolto em papel alumínio, colocado em recipiente térmico resfriado para o transporte e processamento imediato do tecido. Esta etapa durou em média 10 minutos.

Para verificar a presença de imunocomplexos na membrana basal da conjuntiva, foi realizada a técnica de imunofluorescência direta. Em resumo: Congelamento e inclusão do fragmento em “tissue freezing medium”-JUNG® a -20°C (Richat Jung – Tissue Tek). Cortes do tecido foram feitos no criostato a -20°C com 4m de espessura e colocados sobre lâmina contendo adesivo de Poly-lisine e fixado em acetona por 10 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes durante 5 minutos em solução tampão fosfato (pH 7,4). Anticorpos primários conjugados com isotiocianato de fluoresceína – FITC (DAKO A/S Produktionsvej – Denmark) na concentração de: IgG 1:200, IgA 1:20, IgM 1:20, C<sub>3</sub> 1:50, C<sub>1q</sub> 1:10 foram colocados nas lâminas, que ficaram incubadas por uma hora em câmara úmida e escura à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada lavagem por cinco minutos com tampão PBS, por três vezes, e montagem das lâminas em glicerina tamponada. Utilizamos microscópio com iluminação fluorescente vertical para a análise dos tecidos. Para cada biópsia foram realizados controles positivos com rim ou pele de paciente com pênfigo ou lúpus, e controles negativos com fragmento do próprio paciente encubado apenas com albumina do soro bovino 1%, que é utilizado para verificar a auto-fluorescência do tecido.

Foi considerado resultado positivo a observação de depósitos lineares imunoreagentes na membrana basal da conjuntiva.

---

## RESULTADOS

---

Foram incluídos no estudo 13 pacientes, sendo 9 (69,2%) do sexo feminino e 4 (30,8%) do sexo masculino. A idade média dos pacientes era de 72,7 anos, variando entre 60 e 90 anos. Todos os pacientes apresentavam acometimento ocular bilateral e 4 pacientes apresentavam assimetria no estadiamento entre os olhos. Comprometimento da mucosa oral foi observado em 30,4% dos casos (Tabela 1).

Conforme a classificação de Foster, 8 pacientes (61,6%) encontravam-se no estágio III, 1 no estágio IV (7,6%) e 4 (30,8%) apresentavam assimetria de estadiamento entre os olhos. Ao fazermos o estadiamento por olho, verificamos que 20 deles (77%) encontravam-se no estágio III (Figura 1), 4 (15,4%) no estágio IV, 1 (3,8%) no estágio II e 1 olho (3,8%) no estágio I (Tabela 1).

Utilizando a classificação da OMS para deficiência visual, a distribuição da AV correlacionada ao estadiamento do paciente foi a seguinte: estágio I - 1 olho (100%) apresentava cegueira; estágio II - 1 olho (100%) apresentava cegueira; estágio III - 7

olhos (35%) apresentavam AV ≤ 6/18, 4 olhos (20%) apresentavam deficiência visual e 9 olhos (45%) foram classificados como tendo cegueira; estágio IV – 1 olho (25%) apresentava AV ≤ 6/18 e 3 olhos (75%) foram classificados como tendo cegueira. A paciente CDP, classificada com estágio III de Foster, apresentava amaurose secundária a descolamento de retina (Tabela 1).

O resultado da imunofluorescência direta foi positivo em apenas 3 pacientes (23%). A paciente n° 4 do sexo feminino, apresentou depósitos de IgG e C<sub>3</sub>; a paciente n° 6 do sexo feminino, apresentou depósitos de IgA, IgG, IgM, C<sub>3</sub> (Figuras 2 e 3), e o paciente n° 13, do sexo masculino, apresentou depósitos de IgA, IgG e C<sub>3</sub>, mas nenhum deles apresentou depósitos de C<sub>1q</sub> na membrana basal da conjuntiva.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados 13 pacientes com suspeita clínica de PCO; o sexo feminino foi predominante (69,2%) e a idade média foi de 74,5 anos. Esses dados estão de acordo com a literatura<sup>(3,10)</sup>. Foster<sup>(3)</sup> descreveu que o PCO pode iniciar na terceira década de vida, mas devido ao caráter intermitente, com períodos de remissão e exacerbação, o diagnóstico é protelado até que a doença evolua ao estágio III ou IV. Em nosso estudo, 92,3% dos olhos encontram-se no estágio III e IV de Foster, ou

seja, em uma fase avançada da doença. A demora no diagnóstico, que pode ocorrer devido ao caráter intermitente da doença, a falta de acesso a serviço de atendimento terciário em oftalmologia, ou a dificuldade do oftalmologista geral em diagnosticar e conseqüentemente tratar esta doença traz grande prejuízo ao paciente, pois a terapêutica requerida - corticóide, dapsona e agentes imunossupressores - estabiliza o processo na maioria dos casos, mas não regride as lesões oculares existentes<sup>(6,9)</sup>.

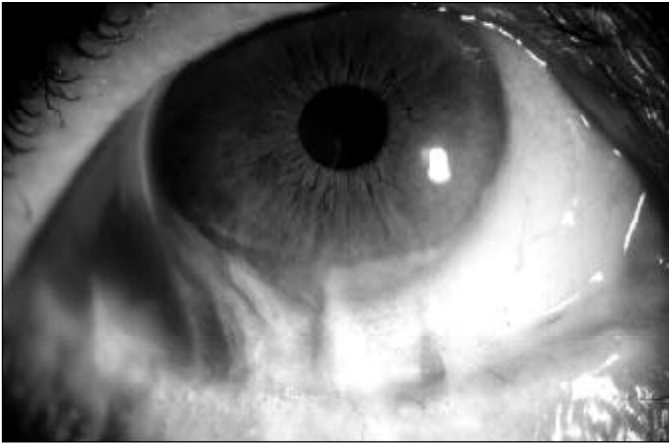
A classificação do PCO é feita classicamente utilizando os parâmetros de Foster e de Mondino, que avalia o grau de redução do fundo de saco inferior. Observamos que 4 (30,8%) pacientes desse estudo apresentavam assimetria de estadiamento entre os olhos. Mondino<sup>(2)</sup> já havia descrito a possibilidade de assimetria, tanto em severidade quanto em progressão da doença entre os olhos. É importante que a documentação seja bastante precisa, utilizando os parâmetros de Foster, Mondino, fotografias na lâmpada de fenda, descrição sobre as alterações corneais, extensão da queratinização e acuidade visual, que não são avaliados nestas classificações<sup>(9)</sup> mas são importantes para o seguimento do paciente e controle na progressão da doença.

Elder<sup>(1)</sup> descreveu pior acuidade visual nos pacientes do estágio IV quando comparado aos outros estágios de Foster. Em nosso estudo, observamos que em apenas 1 olho do estágio IV apresentou acuidade visual de 6/18, enquanto os

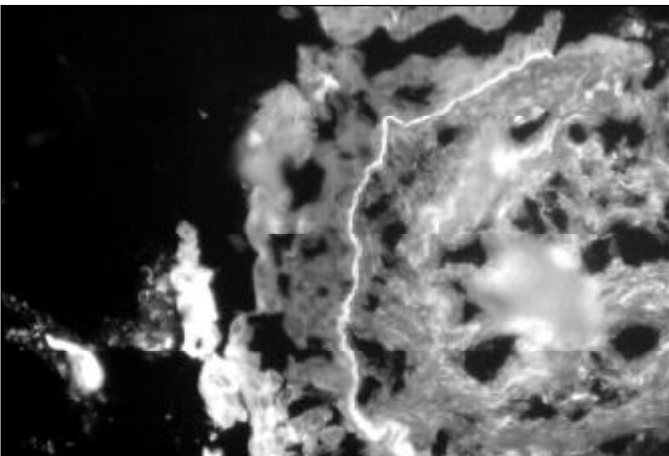
Tabela 1. Dados clínicos e resultados da imunofluorescência dos pacientes com suspeita clínica de Penfigóide Cicatricial Ocular

Caso	Nome	Sexo	Idade	Olho	Estágio da doença*	Acuidade visual	Mucosa oral	Imunofluorescência
1	MFC	F	67	OD	III	6/9	-	Negativo
				OE	III	6/9	-	Negativo
2	HCA	F	81	OD	III	Vultos	-	Negativo
				OE	I	CD 1m	-	Negativo
3	NA	F	67	OD	III	6/30	-	Negativo
				OE	III	6/18	-	Negativo
4	AAS	F	79	OD	III	6/18	Aftas	Positivo
				OE	III	6/60	-	Positivo
5	CF	F	71	OD	III	6/30	Fibrose	Negativo
				OE	III	CD 1m	-	Negativo
6	IHN	F	83	OD	III	6/18	Fibrose	Positivo
				OE	IV	6/18	-	Positivo
7	LB	M	74	OD	III	Vultos	-	Negativo
				OE	III	Vultos	-	Negativo
8	OP	M	70	OD	III	6/6	-	Negativo
				OE	IV	CD 2,5m	-	Negativo
9	ISV	F	79	OD	IV	Vultos	Fibrose	Negativo
				OE	IV	Vultos	-	Negativo
10	CDP	F	79	OD	III	CD 3m	-	Negativo
				OE	III	Amaurose	-	Negativo
11	OBL	F	90	OD	II	CD 3m	-	Negativo
				OE	III	CD 1m	-	Negativo
12	JFS	M	69	OD	III	CD 3m	-	Negativo
				OE	III	6/18	-	Negativo
13	JRF	M	60	OD	III	6/60	-	Positivo
				OE	III	CD 1m	-	Positivo

M= masculino; F= feminino; OD= olho direito; OE=olho esquerdo; CD= contar dedos; m= metro; \*Classificação de Foster



**Figura 1 - Penfigóide cicatricial ocular, grau III de Foster, demonstrando obliteração do fundo de saco inferior e simbléfaro (paciente 6)**

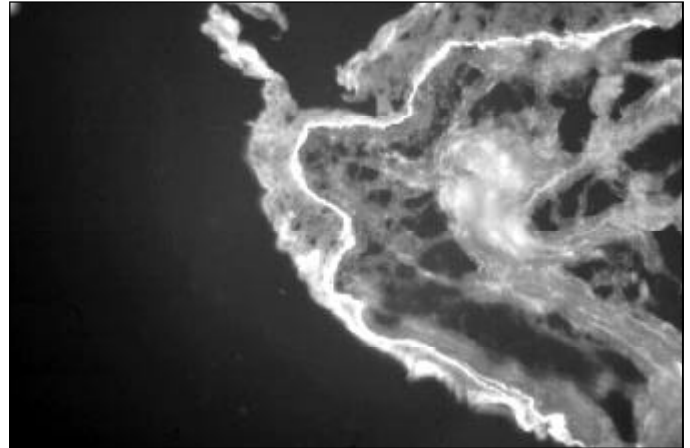


**Figura 2 - Lâmina de imunofluorescência direta (paciente 6), demonstra a presença de depósitos lineares imunoreagentes IgG na membrana basal da conjuntiva (200X)**

outros 3 olhos foram classificados como tendo cegueira. É difícil fazer uma melhor avaliação sobre este aspecto, devido ao número resumido de olhos no estágio I e II, apenas 1 em cada grupo (Tabela 1).

Apesar do diagnóstico do PCO ser clínico, a comprovação laboratorial deve ser realizada, para que a terapêutica seja instituída o mais breve e com a maior segurança possível<sup>(7,11)</sup>. Vários métodos têm sido propostos para auxiliar o diagnóstico do PCO, mas nenhum específico. A microscopia óptica evidencia conjuntivite crônica inespecífica: metaplasia escamosa, perivasculite e infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos e neutrófilos<sup>(6,12)</sup>. A avaliação da superfície ocular por microscopia eletrônica mostra aumento de desmosomas, tonofibrilas e tonofilamentos, separação da membrana basal do epitélio e aumento da camada de muco, quando comparado com indivíduos normais<sup>(13)</sup>.

As técnicas de imunohistopatologia têm por objetivo detectar auto-anticorpos circulantes direcionados à membrana basal ou demonstrar os complexos imunoreagentes deposita-



**Figura 3 - Lâmina de imunofluorescência direta (paciente 6), demonstra a presença de depósitos lineares de imunoreagentes IgG na membrana basal da conjuntiva (400X)**

dos na membrana basal. Falso-positivo pode ocorrer no exame da conjuntiva na úlcera de Mooren's, ceratite estafilocócica e em todos os tecidos no lupus eritematoso sistêmico. Falso-negativo ocorre principalmente no PCO restrito ao olho e nos erros de execução da técnica<sup>(3,6,10)</sup>. A imunofluorescência direta detecta os complexos imunoreagentes na membrana basal; é a técnica mais difundida, por ser de fácil execução e menor custo, quando comparada à imunoperoxidase. A sensibilidade deste método varia na literatura de 30,5 a 67%<sup>(1,6,13-14)</sup>. Em nossa casuística, houve apenas 23% de positividade em casos clinicamente típicos de PCO, porcentagem bem menor que aquela descrita na literatura internacional. Não foi possível comparar com dados nacionais, pois este é o primeiro trabalho que estuda a imunofluorescência no PCO em nosso meio.

Foster<sup>(3)</sup> já havia reportado que a técnica da imunoperoxidase complexo avidina-biotina-peroxidase é aproximadamente 1000 vezes mais sensível na detecção de Imunocomplexos na membrana basal que a imunofluorescência direta. Power et al.<sup>(6)</sup> reportaram aumento de sensibilidade no diagnóstico do PCO com a técnica de imunoperoxidase em relação à imunofluorescência direta (83% e 52% respectivamente), e os imunoreagentes detectados com maior frequência foram IgA, IgG e C<sub>4</sub>. Em nosso estudo 3/3 pacientes apresentaram depósitos de C<sub>3</sub>, IgG e 2/3 apresentaram IgA.

A microscopia imunoeletrônica consiste na associação das técnicas de imunoperoxidase e microscopia eletrônica, possibilitando localizar precisamente os depósitos de imunocomplexos na membrana basal. Hong-Xuan et al.<sup>(10)</sup> relataram que no penfigóide restrito ao olho, os imunocomplexos se depositam na parte superior da lâmina lúcida, são finos e descontínuos. Nos casos em que o penfigóide acomete outros tecidos, os imunocomplexos se depositam na parte inferior da lâmina lúcida e na lâmina densa da membrana basal. E acrescentam que nos casos em que a doença é restrita ao olho, a sensibilidade da técnica de Imunofluorescência direta é menor. Em nosso estudo, 69,2% dos pacientes apresentavam apenas acometimento ocular, isso poderia explicar a baixa positividade encontrada por nós.

Em face de importância do diagnóstico preciso do PCO e dos resultados relatados na literatura<sup>(3,6,10)</sup>, sugerimos a realização das técnicas de imunoperoxidase ou microscopia imunoeletrônica nos casos em que a imunofluorescência direta for negativa.

---

### CONCLUSÃO

---

A maioria dos pacientes encontravam-se em estágio avançado da doença, o que denota retardo no diagnóstico. A imunofluorescência direta apresentou baixa sensibilidade em detectar depósitos de imunocomplexos na membrana basal da conjuntiva, quando comparada aos dados da literatura.

---

### AGRADECIMENTOS

---

As funcionárias: Ivonete e Maria José do laboratório de anatomia patológica, Cleide e Sebastiana do setor de Doenças Externas e Córnea da UNIFESP pela disponibilidade e auxílio técnico.

---

### ABSTRACT

---

**Purpose:** To report the findings in patients with clinical suspicion of ocular cicatricial pemphigoid (OCP) and to present the results of direct immunofluorescence investigation. **Methods:** Prospective study performed at the Federal University of São Paulo. Clinical examination and conjunctival biopsies were performed in thirteen patients (26 eyes) who presented clinical evidence of OCP without systemic immunosuppression therapy or topic anti-glaucoma drug use. Immunofluorescence was immediately performed after obtaining biopsies. **Results:** According to Foster's staging system, the proportions of eyes classified as stage I to IV were 3.8%, 3.8%, 77% and 15.4%, respectively. Only three (3) of thirteen (13) patients (23%) were positive on performing immunofluorescence tech-

nique. **Conclusion:** This study shows that the diagnoses of ocular cicatricial pemphigoid were established at advanced stages of the disease and that direct immunofluorescence presented low sensitivity in detecting immunoreactant deposition along the basement membrane of the conjunctiva, when compared to the literature.

**Keywords:** Benign mucousmembrane pemphigoid/diagnosis; Vesicubullous skin diseases/diagnosis; Basement membrane; Conjunctiva/pathology; Direct fluorescent antibody technique.

---

### REFERÊNCIAS

---

1. Elder MJ, Bernauer W, Leonard J, Dart JK. Progression of disease in ocular cicatricial pemphigoid. *Br J Ophthalmol* 1996;80:292-6.
2. Mondino BJ, Brown SI. Ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1981; 88:95-100.
3. Foster CS. Cicatricial pemphigoid. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1986;84:527-663.
4. Mondino BJ: Bullous disease of the skin and mucous membranes. In: Duane T, editor. *Clinical ophthalmology*. Hagerstown: Haper & Row; 1991. p.1-19.
5. Gomes JAP. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites cicatriciais. *Arq Bras Oftalmol* 2000;63:91-6.
6. Power WJ, Neves RA, Rodriguez A, Dutt JE, Foster CS. Increasing the diagnostic yield of conjunctival biopsy in patients with suspected ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. 1995;102:1158-63.
7. Foster CS, Ahmed AR. Intravenous immunoglobulin therapy for ocular cicatricial pemphigoid: a preliminary study. *Ophthalmology* 1999;106:2136-43.
8. Childs G, Unabia G, The application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localization of pituitary hormones. *J Histochem Cytochem*.1982;30:713-6.
9. Tauber J, Jabbur N, Foster CS. Improved detection of disease progression in ocular cicatricial pemphigoid. *Cornea* 1992;11:446-51.
10. Hoang-Xuan T, Robin H, Demers PE, Heller M, Toutblanc M, Dubertret L. et al. Pure ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1999;106:355-61.
11. Foster CS, Neumann R, Tauber J. Long term results of chemotherapy for ocular cicatricial pemphigoid. *Doc Ophthalmol* 1992;82:223-9.
12. Bernauer W, Elder MJ, Leonard JN, Wright P, Dart JK. The value of biopsies in the evaluation of chronic progressive conjunctival cicatrization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1994;32:533-7.
13. Foster CS, Shaw CD, Well PA. Scanning electron microscopy of conjunctival surfaces in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *Am J Ophthalmol*. 1986;102:584-91.
14. Demers PE, Robin H, Prost C, Toutblanc M, Hoang-Xuan T. Immunohisto-pathologic testing in patients suspected of ocular cicatricial pemphigoid. *Curr Eye Res*.1998;17:823-7.0