



Imunomapeamento nas epidermólises bolhosas hereditárias*

Immunological mapping in hereditary epidermolysis bullosa

Zilda Najjar Prado de Oliveira¹
Lígia M. I. Fukumori³

Alexandre M. Périgo²
Valéria Aoki⁴

Resumo: O imunomapeamento, uma técnica de imunofluorescência, é o método atual mais utilizado para o diagnóstico laboratorial e a diferenciação dos principais tipos de epidermólise bolhosa hereditária, uma vez que determina o plano de clivagem na junção dermo-epidérmica das doenças mecano-bolhosas.

Palavras-chave: Colágeno; Epidermólise bolhosa; Laminina; Microscopia de fluorescência

Abstract: Immunological mapping, an immunofluorescence technique, is currently the method most used to diagnose and differentiate the principal types of hereditary epidermolysis bullosa, since this technique is capable of determining the level of cleavage of this mechanobullous disease

Keywords: Collagen; Epidermolysis bullosa; Laminin; Fluorescence microscopy

INTRODUÇÃO

As epidermólises bolhosas (EBs) hereditárias são dermatoses mecano-bolhosas, que se caracterizam pelo aparecimento de bolhas ou vesículas aos mínimos traumas sobre a pele. Podem acometer somente a pele ou também as mucosas.¹ São divididas em quatro grandes grupos (simples, juncionais, distróficas e mistas, que são muito raras) e em pelo menos 20 fenótipos clínicos distintos, de acordo com o nível de clivagem e as características clínicas e moleculares (Quadro 1).^{2,3}

As principais EBs hereditárias são decorrentes de mutações nos genes que codificam qualquer um dos componentes estruturais dos queratinócitos e da junção dermo-epidérmica, quais sejam: na EBS, queratinas 5 e 14, plectina, $\alpha 6\beta 4$ integrina, placofilina 1 e desmoplaquina; na EBJ, laminina 332 (anteriormente denominada laminina 5), colágeno tipo XVII (ou antígeno 2 do penfigoide bolhoso) e $\alpha 6\beta 4$ integrina; na EBD, colágeno tipo VII. As mutações provocam alterações dessas proteínas que são responsáveis pelos defeitos de adesão entre as estruturas que constituem a pele, levando à formação das bolhas.

As formas de EB hereditária foram mais bem caracterizadas após a introdução da microscopia eletrônica de transmissão, primeiramente realizada por Pearsons em 1962.⁴ Posteriormente se utilizaram anticorpos monoclonais para melhor caracterização dos fenótipos.^{5,6,7,8} Em 1991, Bonifas⁹ foi o pioneiro em demonstrar as alterações moleculares em uma forma de EB (EB simples). Posteriormente, foi estabelecida a base molecular de outros subtipos de EB.

DIAGNÓSTICO DAS EPIDERMÓLISES BOLHOSAS

O diagnóstico de EB é clínico e laboratorial, mas é sempre importante levar em consideração a história familiar e a consanguinidade dos pais. Os subtipos de EB somente podem ser diferenciados por meio de estudos imunohistoquímicos e ultraestruturais, além da diferenciação genética, que não está disponível na maioria dos grandes centros. A importância da subclassificação é para determinar o risco de comprometimento mucoso, de desenvolvimento de neoplasias e de morte prematura. É também importante para o aconselhamento genético.¹⁰⁻¹⁴

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 18.06.2010.

* Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia, Laboratório de Imunopatologia Cutânea, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / *Conflict of interest: None*

Suporte financeiro / *Financial funding: trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CNPq processo 303493/2008-9*

¹ Professor doutor, Departamento de Dermatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP), Brasil.

² Biologista, Laboratório de Imunopatologia Cutânea, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Departamento de Dermatologia, Laboratório de Imunopatologia Cutânea, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP), Brasil.

³ Biologista, Laboratório de Imunopatologia Cutânea, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Departamento de Dermatologia, Laboratório de Imunopatologia Cutânea, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor doutor, Departamento de Dermatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – São Paulo (SP), Brasil.

QUADRO 1: Classificação mais recente das epidermólises bolhosas hereditárias

<p>EB simples (EBS): EBS localizada EBS Dowling-Meara EBS com distrofia muscular EBS autossômica recessiva EBS superficial EBS com deficiência de placofilina 1 EBS com atresia do piloro</p> <p>EB juncional (EBJ): EBJ Herlitz EBJ não Herlitz EBJ com atresia do piloro</p> <p>EB distrófica dominante (EBDD): EBDD generalizada EBDD dermatose bolhosa do neonato</p> <p>EB distrófica recessiva (EBDR): EBDR generalizada grave EBDR generalizada outra EBDR dermatose bolhosa do neonato</p>

O exame laboratorial mais executado é o anatomopatológico (AP), oriundo de material de biópsia de bolha íntegra. Não é diagnóstico de EB, mas é útil para fazer a diferenciação com outras dermatoses bolhosas. O AP pode diferenciar a EB simples das outras formas, uma vez que é a única EB em que o nível de clivagem é intraepidérmico. A EBJ e a EBD não podem ser diferenciadas pelo AP.

Para determinar os diferentes planos de clivagem que caracterizam os diversos subtipos de EB, devem ser realizados o imunomapeamento (IMM) ou a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Esta última também permite a análise de alterações ultraestruturais nos queratinócitos e na junção dermo-epidérmica características dos subtipos de EB. A MET é o método laboratorial considerado padrão ouro para diferenciação entre as formas de EB. Porém, é dispendiosa, consome muito tempo para a execução e leitura, não permite visualizar a clivagem como um todo e é somente disponível em centros especializados.

O imunomapeamento possui precisão diagnóstica semelhante à da microscopia eletrônica, com a vantagem da execução e leitura mais simples e rápidas.¹⁵ Como está associado ao uso de anticorpos monoclonais, pode dar subsídios para diferenciar os maiores subtipos de EB e de diferentes proteínas estruturais mutadas.³ Além de permitir a visualização da clivagem como um todo, o IMM diferencia as formas dominante e recessiva de EBD. Apresenta, também, a vantagem de poder colocar o espécime obtido por

biópsia em meio de transporte (meio de Michel) para ser enviado ao laboratório em que será realizado o exame, em qualquer lugar do país ou do mundo.¹⁶ O material preservado nesse meio pode ser processado de maneira ideal em até sete dias, embora haja preservação da sua antigenicidade por algumas semanas.³ Também pode ser útil no aconselhamento genético e, especialmente se realizado precocemente em biópsia de pele fetal, permite fazer o prognóstico do paciente.¹⁵

O IMM pode ser considerado uma técnica de imunofluorescência indireta, uma vez que é necessário, inicialmente, promover a formação do imunocomplexo pela adição de um anticorpo (Ac) primário ao tecido a ser pesquisado. A seguir, para a revelação desse imunocomplexo, utiliza-se um Ac secundário marcado com fluorocromo. Fluorocromos são corantes que emitem luz em um comprimento de onda específico quando estimulados por radiação ultravioleta. É usada, mais frequentemente, a fluoresceína, de coloração verde-limão.

O conhecimento profundo da constituição dermo-epidérmica e das estruturas proteicas presentes na zona da membrana basal (ZMB) e nos queratinócitos basais é mandatório para uma interpretação correta do imunomapeamento. A ZMB é composta por um grupo de estruturas que se combinam e formam complexos de ancoragem. Nas porções superiores da ZMB, os filamentos intermediários do citoesqueleto das células basais se inserem na membrana plasmática das células basais – os hemidesmossomos. Os filamentos de ancoragem conectam os hemidesmossomos à lâmina densa (LD) e fibrilas de ancoragem (FA), atravessando a lâmina lúcida (LL). Na parte inferior da ZMB, o colágeno tipo VII está presente nas fibrilas de ancoragem que se estendem da lâmina densa em direção à derme papilar e se combinam com fibrilas de colágeno intersticial. Desse modo, a ZMB conecta o citoesqueleto das células basais com a rede de fibrilas do colágeno intersticial da derme, promovendo a sustentação da pele^{16,17} (Figura 1).

Para o IMM nas epidermólises bolhosas simples, é importante o conhecimento das queratinas 5 e 14 dos queratinócitos (K5 e K14), que se combinam para formar os filamentos intermediários e estão alteradas, na maioria dos casos em que a clivagem é intraepidérmica, na camada basal. Para as outras formas de epidermólise bolhosa, são relevantes: a laminina, quando a clivagem é intralâmina lúcida (EBJ); o colágeno IV, para a clivagem na sublâmina densa (EBD); o colágeno VII, componente das fibrilas de ancoragem e que se localiza na sublâmina densa.^{16,17} Conhecendo-se previamente os componentes da ZMB, a maioria dos diferentes tipos de epidermólise bolhosa hereditária

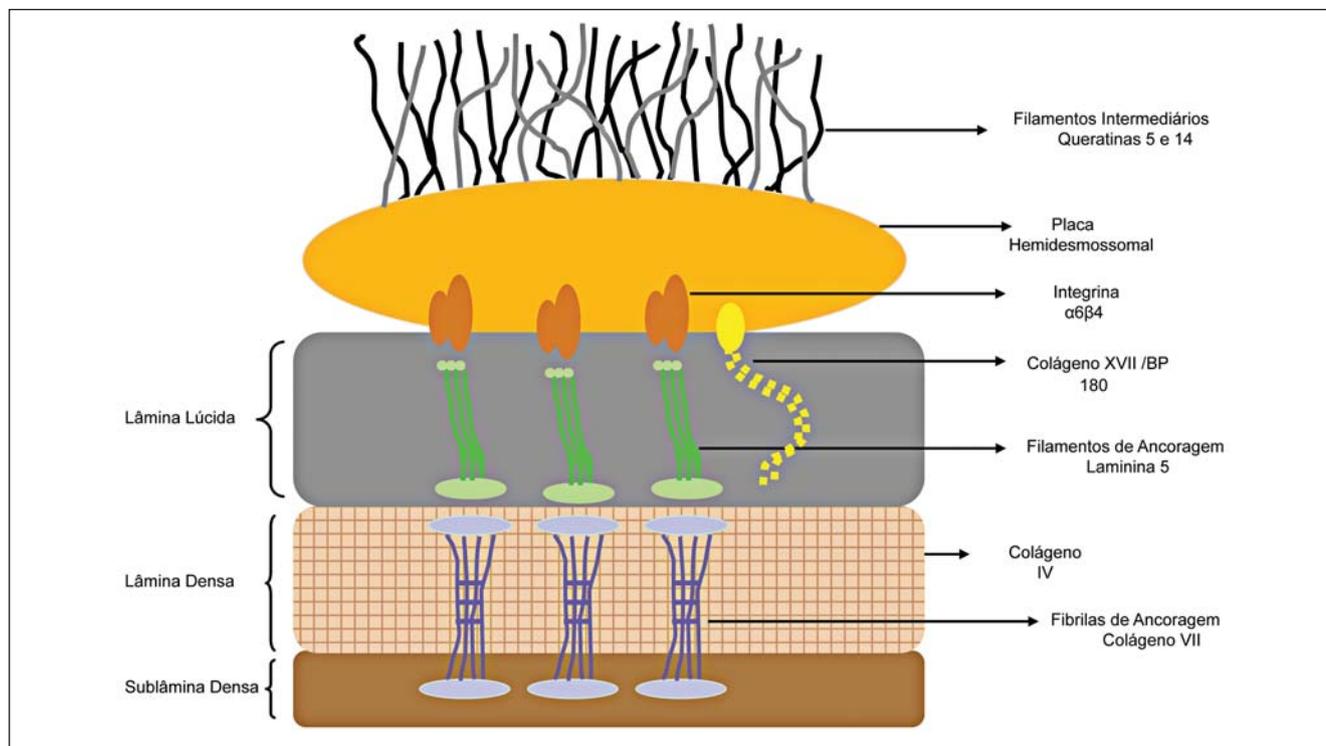


FIGURA 1: Representação esquemática da junção dermo-epidérmica e das principais proteínas estruturais envolvidas nas epidermólises bolhosas congênitas

podem ser identificados pelo imunomapeamento, analisando-se a localização do depósito fluorescente.

TÉCNICA DO IMUNOMAPEAMENTO

O material a ser processado deve ser obtido de biópsia de pele contendo uma bolha ou vesícula recente e íntegra, cujo tamanho não pode ultrapassar os limites do diâmetro do *punch* para que não se rompa, o que impediria a leitura do exame. Pode-se fazer a retirada, também, por excisão em fuso, englobando a bolha ou vesícula, embora esse procedimento exija maior habilidade do dermatologista, já que pode haver descolamento da pele no momento tanto da incisão como da sutura. Se as bolhas do paciente forem muito grandes, pode ser obtida uma lesão recente com movimentos rotatórios de uma borracha pequena arredondada (como aquelas que são fixadas aos lápis) em uma área de pele sem lesão, até que se provoque separação entre a epiderme e a derme.

O fragmento de pele obtido deve ser colocado em meio de Michel ou congelado a fresco em meio próprio para congelamento. Esse procedimento permite que a antigenicidade do tecido seja bem preservada, o que não ocorre em métodos mais agressivos, como a fixação em formol e o emblocamento em parafina. Do tecido congelado são feitos cortes com 4 micra de espessura, depositados em lâmina de vidro silanizada, que serão expostos a um painel de anticorpos monoclonais que irão se ligar a proteínas estruturais

de localização conhecida na ZMB. Por se conhecer previamente a localização dessas estruturas, é possível demonstrar, de forma mais específica, o nível da clivagem, correlacionando o local da formação da bolha em estudo com a distribuição da fluorescência. A presença ou ausência de fluorescência com um anticorpo particular na porção epidérmica e/ou dérmica da clivagem indica de maneira precisa o nível em que se localiza a lesão do paciente em questão.³

Para marcar a ZMB são utilizados diferentes anticorpos monoclonais em todo o mundo. Segundo Fine,³ são importantes os anticorpos contra o antígeno do penfigoide bolhoso, laminina 1, colágeno tipo IV e queratina 14 para determinar o nível de clivagem intraepidérmica, intralâmina lúcida e sublâmina densa. Também o autor refere que para determinar outros tipos de alteração (EBS recessiva, EBJ, EBD recessiva, EB com distrofia muscular), são necessários os anticorpos mono e policlonais contra laminina 332 (anteriormente conhecida como laminina 5), colágeno tipo VII, colágeno tipo XVII, plectina e $\alpha 6 \beta 4$ integrina. Existem variantes clínicas de EB em que há ausência de fluorescência com determinado anticorpo monoclonal estabelecendo o diagnóstico de certeza, como ocorre com a ausência de laminina 332 na EBJ Herlitz e de colágeno VII na EBD.

No Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, utilizam-se na marcação da ZMB:¹⁸ hemidesmosomos

– soro de paciente com penfigoide bolhoso; lâmina lúcida – Ac monoclonal antilaminina 5; lâmina densa – Ac monoclonal anticolágeno tipo IV; sublâmina densa – Ac monoclonal anticolágeno tipo VII (fibrilas de ancoragem). Os anticorpos monoclonais são adquiridos comercialmente e produzidos em linhagens específicas de camundongos.³

Um exemplo de protocolo utilizado por nosso laboratório (HC-FMUSP) é descrito a seguir: os cortes provenientes da biópsia da pele do paciente permanecem expostos aos anticorpos por 30 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente; são lavados em tampão de trizma base (pH 7,0) por 20 minutos; a ligação dos anticorpos primários com seus antígenos correspondentes é revelada com o uso de uma anti-IgG humana conjugada à fluoresceína para a marcação do antígeno do penfigoide bolhoso (AgPB) e uma anti-IgG murina policlonal para marcar os outros anticorpos monoclonais. Após 30 minutos, os cortes são novamente lavados como descrito acima e as lâminas são preparadas com glicerina tamponada (pH 9,0) e cobertas com lamínula de vidro para a leitura em microscópio de fluorescência (microscópio de epiluminescência ou um confocal).¹⁹

Com o uso do IMM, os principais tipos de EB hereditária podem ser identificados, analisando-se a localização do depósito fluorescente ou mesmo a sua ausência. Sendo assim, são obtidos os seguintes achados nos diferentes subtipos de EB:

EPIDERMÓLISE BOLHOSA SIMPLES (EBS)

A clivagem ocorre na camada basal, e observa-se depósito de fluorescência no assoalho da bolha (lado dérmico) com todos os marcadores antigênicos, pois

os marcadores utilizados (AgPB, laminina, colágenos IV e VII) se localizam abaixo da clivagem observada no paciente (Figura 2).

EPIDERMÓLISE BOLHOSA JUNCIONAL (EBJ)

Há alterações das proteínas componentes dos filamentos de ancoragem, que se conectam aos hemidesmossomos e às fibrilas de ancoragem. O nível de clivagem ocorre na lâmina lúcida. Observa-se depósito de fluorescência no teto da bolha (lado epidérmico) com o AgPB e fluorescência no assoalho da bolha (lado dérmico) com os demais marcadores (Figura 3). Em alguns casos, pode haver depósito fluorescente no teto e no assoalho da bolha com o anticorpo antilaminina.

EPIDERMÓLISE BOLHOSA DISTRÓFICA (EBD)

Estão presentes mutações nos genes que codificam o colágeno VII, principal componente das fibrilas de ancoragem que ligam a ZMB à derme. O nível de clivagem se dá na sublâmina densa. Na EBD dominante (EBDD), o depósito de fluorescência ocorre no teto da bolha (lado epidérmico) com todos os marcadores (Figura 4). Em alguns casos pode-se notar fluorescência no teto e no assoalho da bolha com o anticorpo anticolágeno VII.

Na EBD recessiva (EBDR), observa-se fluorescência muito diminuída ou ausente com o Ac anticolágeno VII (Figura 5). A diminuição ou ausência de fluorescência com o Ac anticolágeno VII permite o diagnóstico preciso dessa variante tão grave de EB.

CONCLUSÃO

O imunomapeamento apresenta, em relação à microscopia eletrônica, a vantagem de ser uma técnica de

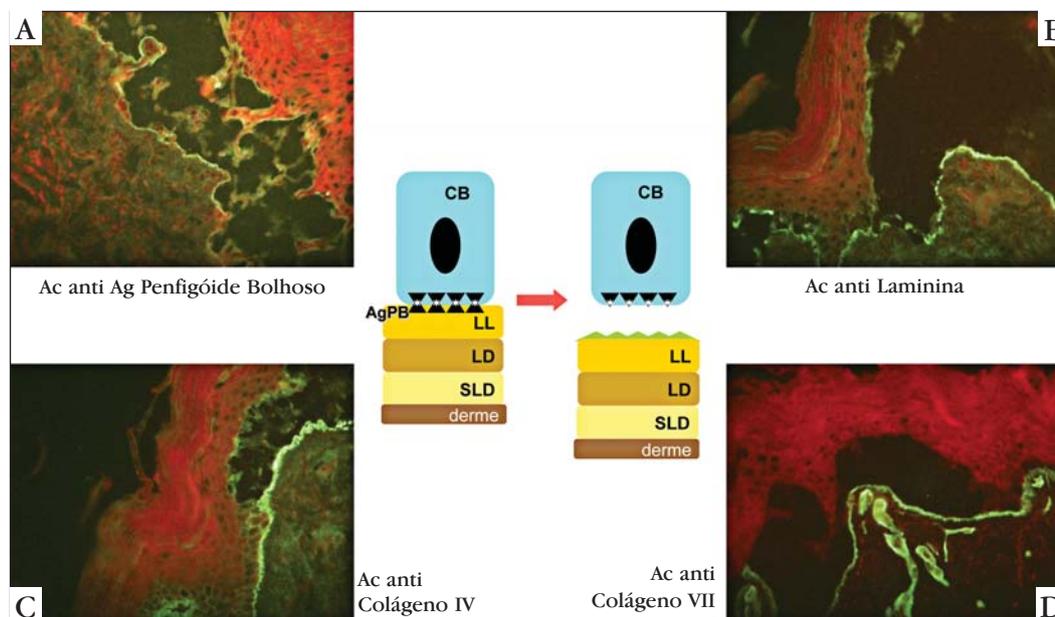


FIGURA 2: Representação esquemática indicando o sítio de clivagem na epidermólise bolhosa simples (EBS). Nas figuras A, B, C e D, a localização do depósito de fluorescência com os quatro principais anticorpos marcadores (CB = célula basal, AgPB = antígeno do penfigoide bolhoso, LL = lâmina lúcida, LD = lâmina densa, SLD = sublâmina densa). Todos os anticorpos marcam o assoalho da bolha, demonstrando clivagem intraepidérmica

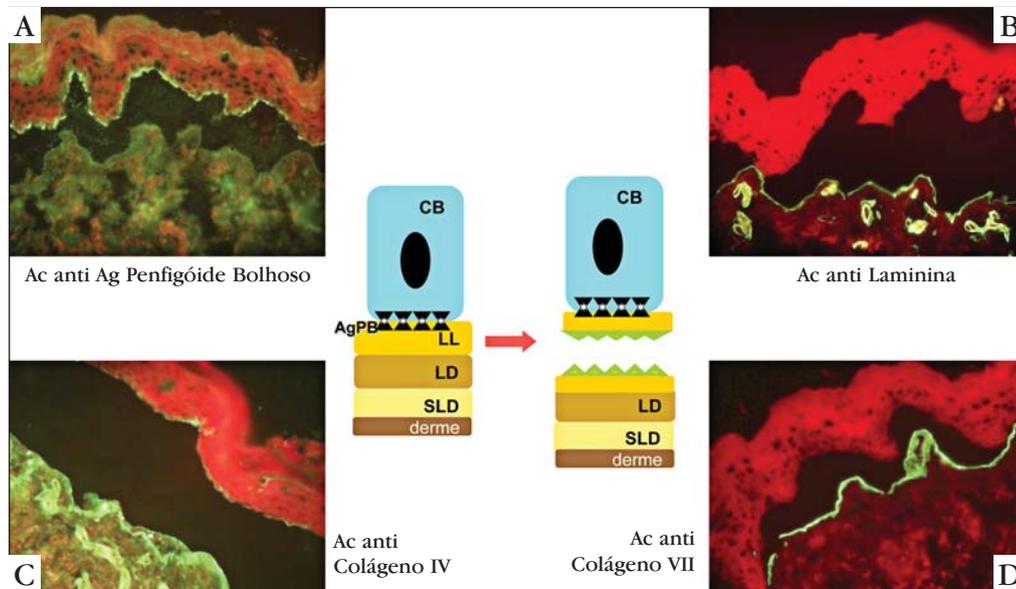


FIGURA 3: Representação esquemática indicando o sítio de clivagem na epidermólise bolhosa juncional (EBJ). Nas figuras A, B, C e D, a localização do depósito de fluorescência com os quatro principais anticorpos marcadores (CB = célula basal, AgPB = antígeno do penfigoide bolhoso, LL = lâmina lúcida, LD = lâmina densa, SLD = sublâmina densa). O Ac antiPB no teto da bolha e os restantes no assoalho indicam clivagem na lâmina lúcida

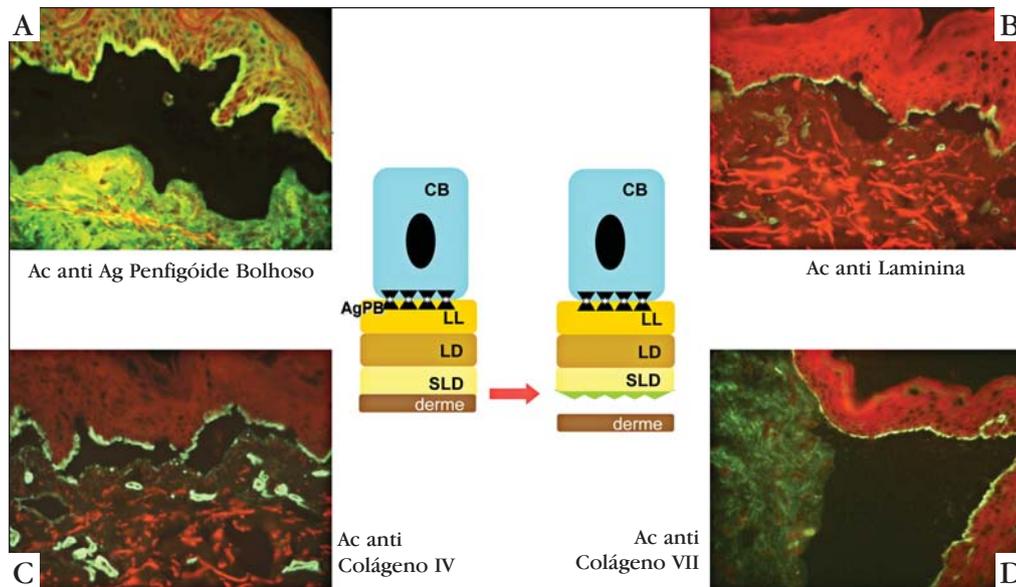


FIGURA 4: Representação esquemática indicando o sítio de clivagem na epidermólise bolhosa distrófica dominante (EBDD). Nas figuras A, B, C e D, a localização do depósito de fluorescência com os quatro principais anticorpos marcadores (CB = célula basal, AgPB = antígeno do penfigoide bolhoso, LL = lâmina lúcida, LD = lâmina densa, SLD = sublâmina densa). Todos os anticorpos marcam o teto da bolha, demonstrando clivagem na sublâmina densa

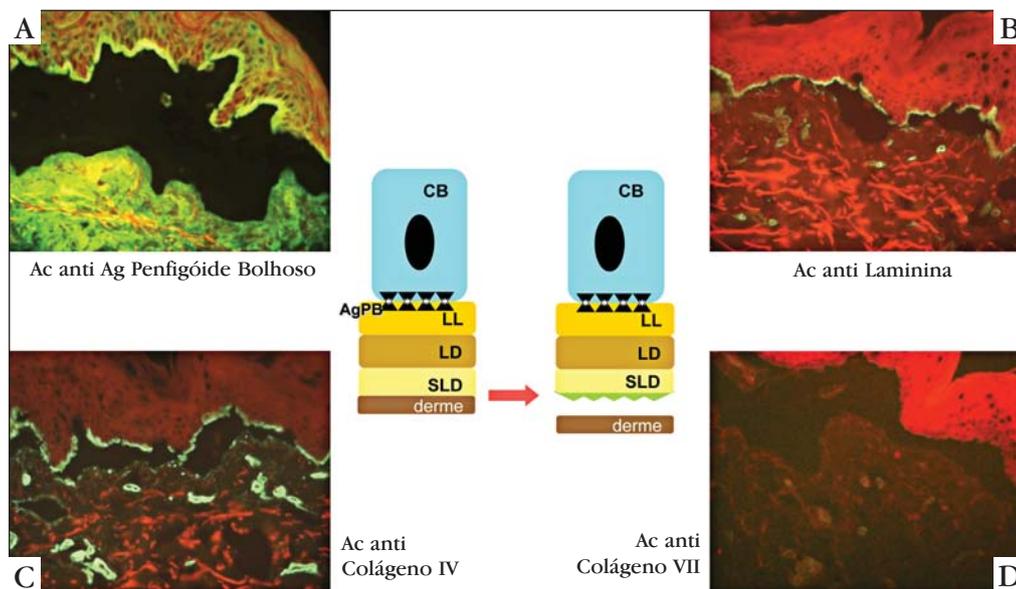


FIGURA 5: Representação esquemática indicando o sítio de clivagem na epidermólise bolhosa distrófica recessiva (EBDR). Nas figuras A, B, C e D, a localização do depósito de fluorescência com os quatro principais anticorpos marcadores (CB = célula basal, AgPB = antígeno do penfigoide bolhoso, LL = lâmina lúcida, LD = lâmina densa, SLD = sublâmina densa). Três anticorpos marcam o teto da bolha, demonstrando clivagem na sublâmina densa. Observe negatividade do Ac anti-colágeno VII

rápida e simples execução e leitura, que identifica proteínas específicas e visualiza a clivagem como um todo. Desse modo, demonstrando o nível de clivagem, permite subclassificar as EBs em subgrupos (EBS, EBJ e EBD) e algumas vezes de suas variantes. Permite detectar as formas dominantes e recessivas da EBD de maneira menos trabalhosa e dispendiosa do que a microscopia eletrônica.²⁰ Outra vantagem do IMM é a viabilidade de transporte do espécime quando imerso em meio de

Michel por até uma semana para o laboratório em que será realizado. Atualmente é o método mais utilizado para o diagnóstico laboratorial e diferenciação dos principais tipos de epidermólise bolhosa. A determinação dos subtipos de EB é relevante para o aconselhamento genético e para o prognóstico da doença. É ainda possível realizar a diagnose de EB intraútero a partir de biópsia da pele fetal em alguns países. □

REFERÊNCIAS

- Gedde-Dahl Jr T. Epidermolysis Bullosa. A clinical, genetic and epidemiologic study. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1971. p.1-180.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Briggaman RA, Bruckner-Tuderman L, Christiano A, et al. Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:1051-66.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58:931-50.
- Pearson RW. Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1962;39:551-75.
- Goldsmith LA, Briggaman RA. Monoclonal antibodies to anchoring fibrils for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1983;81:464-6.
- Fine JD, Breathnach SM, Hintner H, Katz SI. KF-1 monoclonal antibody defines a specific basement membrane antigen defect in dystrophic forms of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1984;82:35-8.
- Heagerty AH, Kennedy AR, Leigh IM, Purkis P, Eady RA. Identification of an epidermal basement membrane defect in recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa by LH 7:2 monoclonal antibody: use in diagnosis. *Br J Dermatol.* 1986;115:125-31.
- Heagerty AH, Kennedy AR, Eady RA, Hsi BL, Verrando P, Yeh CJ, et al. GB3 monoclonal antibody for diagnosis of junctional epidermolysis bullosa. *Lancet.* 1986;1:860.
- Bonifas JM, Rothman AL, Epstein E. Linkage of epidermolysis bullosa simplex to probes in the region of keratin gene clusters on chromosomes 12q and 17q. *J Invest Dermatol.* 1991;39:503A.
- Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Stein A, Cash S, Deleoz J, et al. Eye involvement in inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry. *Am J Ophthalmol.* 2004;138:254-62.
- Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Stein A, Cash S, Deleoz J, et al. Pseudosyndactyly and musculoskeletal contractures in inherited epidermolysis bullosa: experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry, 1986-2002. *J Hand Surg.* 2005;30:4-22.
- Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Tracheolaryngeal complications of inherited epidermolysis bullosa. *Laryngoscope.* 2007;117:1652-60.
- Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr.* 2008;152:276-80.
- Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Gastrointestinal complications of inherited epidermolysis bullosa: cumulative experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46:147-58.
- Hintner H, Fritsch PO, Foidart JM, Stingi G, Schuler G, Katz SI. Expression of basement membrane zone antigens at the dermo-epibolic junction in organ cultures of human skin. *J Invest Dermatol.* 1980;74:200-4
- Mutasim D, Pelc N, Supapannachart N. Established methods in the investigation of bullous diseases. *Dermatol Clinics.* 1993;11:399-418.
- Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:651-8.
- Alves ACF, Cymbalista NC, Oliveira ZNP, Machado MCRM, Sotto MN, Prianti MG, et al. Imunomapeamento no diagnóstico das epidermólises bolhosas hereditárias distróficas. *An Bras Dermatol.* 2001;76:551-60.
- Marinkovich MP. Update on inherited bullous dermatoses. *Dermatol Clin.* 1999;17:473-85.
- Oliveira ZNP. Imunomapeamento nas Epidermólises bolhosas. 3 ed. In: Rivitti EA, Sampaio SAP. *Dermatologia.* São Paulo: Artes Médicas; 1998.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Valéria Aoki

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255.

Laboratório de Imunopatologia Cutânea

3º andar ICHC, sala 3016.

05403 000 - São Paulo – SP, Brasil.

Tel./fax: 11 3069-8036.

E-mail: valaoki@hotmail.com

Como citar este artigo/How to cite this article: Oliveira ZNP, Perigo AM, Fukumori LMI, Aoki V. Imunomapeamento nas epidermólises bolhosas hereditárias. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):856-61.