

Estudo da imunofluorescência direta, imunomapeamento e microscopia ótica na porfiria cutânea tardia

Study of direct immunofluorescence, immunofluorescence mapping and light microscopy in porphyria cutanea tarda

Fátima Mendonça Jorge Vieira ¹
Zilda Najjar Prado de Oliveira ³

Valéria Aoki ²
José Eduardo Costa Martins ⁴

Resumo: FUNDAMENTO: Apesar de a porfiria cutânea tardia ser a mais frequente das porfirias, há poucos estudos que abordam sua fisiopatologia cutânea.

OBJETIVO: Avaliar as alterações cutâneas na porfiria cutânea tardia utilizando a microscopia ótica e a imunofluorescência direta, antes e depois do tratamento com cloroquina. Realizar o imunomapeamento antigênico da bolha para estudo do seu nível de clivagem.

MÉTODOS: Relata-se a microscopia ótica e imunofluorescência direta de 28 pacientes em três fases diferentes: 23 pacientes com porfiria ativa antes do tratamento (Fase A), sete pacientes com remissão clínica durante o tratamento (Fase B) e oito pacientes com remissão bioquímica (Fase C). O imunomapeamento foi realizado em sete pacientes.

RESULTADOS: Na porfiria ativa, a imunofluorescência direta demonstrou fluorescência homogênea e intensa no interior e na parede dos vasos e na junção dermoepidérmica. Na remissão clínica (Fase B) e na remissão bioquímica (Fase C), o depósito de imunoglobulinas se manteve, mas o depósito de complemento apresentou diminuição na maioria. O imunomapeamento não demonstrou plano de clivagem fixo.

CONCLUSÃO: Não houve correlação entre a resposta clínica e os depósitos de imunoglobulinas. A diminuição do complemento favorece a hipótese de que a ativação da cascata do complemento representa uma via adicional que leva à lesão endotelial.

Palavras-chave: Imunofluorescência; Microscopia; Porfiria cutânea tardia; Porfiria cutânea tardia/fisiopatologia

Abstract: BACKGROUND: Even though porphyria cutanea tarda is the most frequent type of porphyria, there are few studies about its cutaneous physiopathology.

OBJECTIVE: To evaluate skin changes in porphyria cutanea tarda using light microscopy and direct immunofluorescence before and after treatment with chloroquine. To perform antigen immunomapping of bullae to study their level of cleavage.

METHODS: Light microscopy and direct immunofluorescence of 28 patients are reported in three different phases: 23 patients with active porphyria before treatment (Phase A), 7 patients with clinical remission during treatment (Phase B), and 8 patients with biochemical remission (Phase C). Immunomapping was performed on 7 patients.

RESULTS: In active porphyria, direct immunofluorescence showed homogenous and intense fluorescence on the inside and on the walls of blood vessels as well as in the dermal-epidermal junction. In clinical remission (Phase B) and biochemical remission (Phase C), the deposit of immunoglobulins was maintained, but the deposit of complement was reduced in most cases. Immunomapping revealed no standard cleavage plane.

CONCLUSION: No correlation was observed between clinical response and immunoglobulin deposits. The reduction of complement favors the hypothesis that activation of the complement cascade represents an additional pathway that leads to endothelial damage.

Keywords: Fluorescent antibody technique; Microscopy; Porphyria cutanea tarda; Porphyria cutanea tarda/physiopathology

Recebido em 26.04.2009.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 18.06.10.

* Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/Fmusp) – São Paulo (SP), Brasil.

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

Suporte financeiro: Nenhum / *Financial funding: None*

¹ Mestre em Ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Fmusp) – São Paulo (SP), Brasil.

² Doutora em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Fmusp); docente do Departamento de Dermatologia da Fmusp – São Paulo (SP), Brasil.

³ Doutora em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Fmusp); diretora técnica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Fmusp – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor emérito do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Fmusp) – São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

A porfiria cutânea tardia (PCT), forma mais frequente de porfiria, se caracteriza pela deficiência parcial da uroporfirinogênio decarboxilase. A imunofluorescência direta (IFD) da pele lesada apresenta depósito de imunoglobulinas (Ig) G, M e A e/ou complemento (C3) com fluorescência característica, que se estende da parede à luz dos vasos e na junção dermoepidérmica (JDE).^{1,2} A pele foi avaliada com a microscopia ótica e a IFD, antes e depois do tratamento com cloroquina, com o objetivo de investigar possíveis correlações entre o tratamento e as alterações cutâneas. Para conhecer melhor a fisiopatologia das lesões na PCT, as bolhas subepidérmicas foram submetidas a: imunomapeamento antigênico; imunofluorescência indireta, que utiliza anticorpos específicos marcados, direcionados contra antígenos conhecidos da JDE, como o antígeno do penfigoide bolhoso, a laminina, o colágeno tipo IV e o colágeno tipo VII, para determinar o nível da clivagem na JDE.³ O antígeno do penfigoide bolhoso fica acima da lâmina lúcida nas células epidérmicas da camada basal. A laminina, uma glicoproteína não colágena, presente na membrana basal, tem sido implicada na adesão das células epidérmicas à membrana basal e é o principal componente da lâmina lúcida. O colágeno tipo IV é o principal elemento da lâmina densa da membrana basal. O colágeno tipo VII compõe as fibrilas ancorantes que se localizam na sublâmina densa. Como a localização dos antígenos na membrana basal da bolha é conhecida, pode-se estabelecer o nível exato da clivagem subepidérmica.⁴ Nas diversas doenças bolhosas, esse método pode ajudar no diagnóstico diferencial.

MATERIAL E MÉTODO

O delineamento do estudo foi não direcional e ambispectivo. No início, obtiveram-se de forma transversal todos os dados dos pacientes já em seguimento no ambulatório e, durante três anos, incluíram-se todos os casos novos e os dados dos pacientes que apresentavam remissão clínica e/ou bioquímica após o tratamento. Utilizou-se a planilha Excel[®] (Microsoft[®]) para descrever os dados e aplicaram-se medidas para a análise da frequência de alguns fatores na população de estudo. Descreveram-se as proporções de cada achado e, para a análise comparativa de alguns dados, aplicou-se o Teste Exato de Fisher, considerando-se um nível de significância de 0,05. Para a análise estatística, utilizou-se o programa estatístico SPSS para Windows, versão 10.0.

Pacientes

Os pacientes responderam, após assinatura do consentimento livre e esclarecido, a questões relacionadas ao objeto da pesquisa e tiveram material coletado conforme descrito no item a seguir. Vinte e oito

pacientes com PCT foram selecionados para este estudo, com idades variando de 16 a 66 anos. O diagnóstico de PCT baseou-se em: 1 – manifestações clínicas típicas; 2 – teste de *screening* com a lâmpada de Wood (Método de Rimington e Rimington-Doyle)⁵ para detectar porfirinas na urina, fezes e hemácias; 3 – exame de urina de 24 horas com aumento da concentração de uroporfirina (URO) pelo menos três vezes maior que o nível de coproporfirina (Copro), ou seja, a relação URO/Copro maior que 3:1;⁶ e 4 – histologia e imunofluorescência direta. A quantificação das porfirinas urinárias na urina de 24 horas foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (Clae).⁷ O padrão de excreção das porfirinas urinárias é diagnóstico para a PCT.⁶ Os pacientes anúricos ou sem o padrão de excreção das porfirinas (relação URO/Copro maior que 3:1) foram excluídos do estudo. O desaparecimento das bolhas e a melhora da fragilidade cutânea foram os critérios usados para remissão clínica e a redução das porfirinas totais na urina de 24 horas para parâmetros normais (mulheres < 159 µg e homens < 199 µg) foi considerada remissão bioquímica.

Biópsias de pele

As biópsias para histopatologia e IFD foram obtidas conforme o organograma descrito (Figura 1). Estudaram-se 28 pacientes no total. Em 23 deles (Fase A), colheu-se a primeira biópsia de pele da pele lesada, independentemente da sua localização. Cinco pacientes já estavam em tratamento e não apresentavam biópsia da pele antes de iniciá-lo. Em sete deles (Fase B), a biópsia foi obtida da pele clinicamente normal do dorso da mão (pele exposta) durante o tratamento com cloroquina e em remissão clínica, porém sem remissão bioquímica. Em oito pacientes (Fase C), realizou-se a biópsia na pele clinicamente normal do dorso da mão, quando em remissão clínica e bioquímica (porfiria inativa). Em sete pacientes com PCT ativa (Fase A), procedeu-se a uma biópsia independente das demais, da região perilesional à bolha, para o imunomapeamento antigênico da JDE.

Histopatologia

Para o exame histopatológico, os fragmentos de pele foram fixados em formol a 10%, embebidos em parafina e submetidos à técnica histológica de rotina com coloração pela hematoxilina-eosina, *periodic acid-Schiff* (PAS) e coloração de Perls (para identificar hemossiderina).

Imunofluorescência direta (IFD)

O fragmento de pele foi transportado em gaze umedecida com solução fisiológica a 0,9%, levado para criopreservação imediata no meio de inclusão para espécimes (*tissue freezing medium*, marca

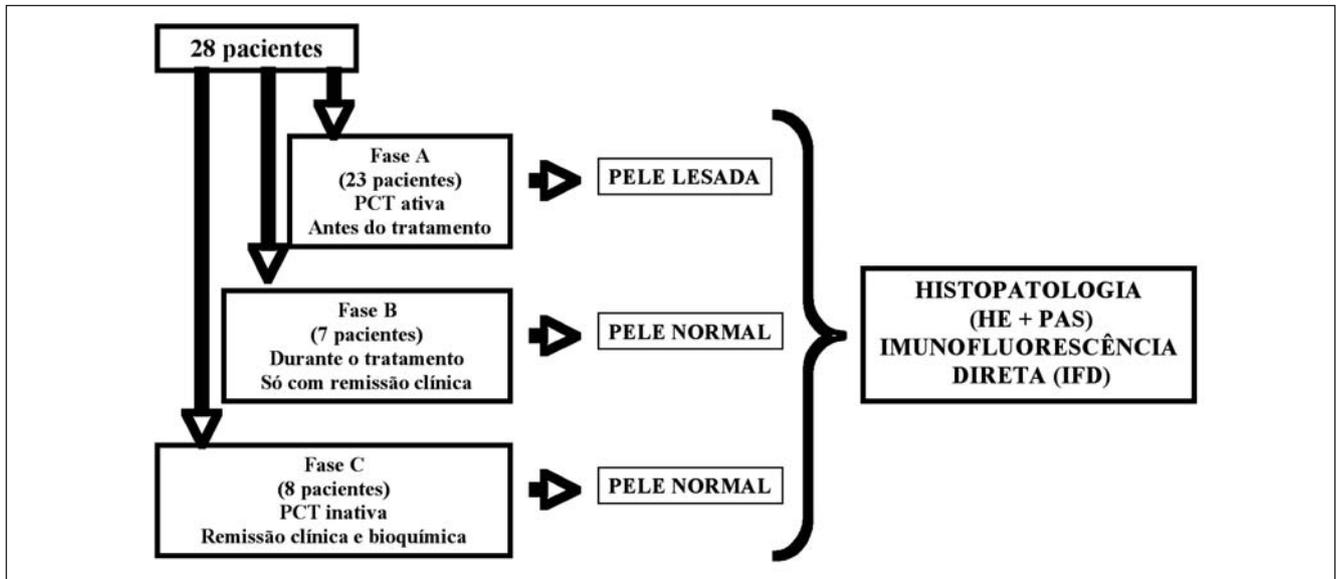


FIGURA 1: Organograma para obtenção das biópsias nas diferentes fases (A, B e C)

Leica) e estocado no freezer a -20°C até o momento da criomicrotomia. Após a criosecção, depositaram-se três cortes, de 4μ de espessura, sobre as lâminas albuminizadas. As lâminas foram colocadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, e, sobre os cortes, foram adicionados os conjugados (anti-immunoglobulinas humanas produzidas em animais imunizados e marcados com isotiocianato de fluoresceína). Os conjugados foram diluídos em TBS pH 7,5 (*trizma buffer saline* - tampão acetato de cálcio) contendo 3mg% de corante Azul de Evans (marca Interlab). Foram utilizados anti-IgA humana, marca Sigma (diluição de 1:20); anti-IgM humana, marca Sigma (diluição de 1:20); anti-IgG humana, marca Sigma (diluição de 1:130) e anti-C3 humano, marca Dako (diluição 1:40). Para cada lâmina, usou-se um conjugado. Após um período de 30 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em TBS pH 7,5 por duas vezes durante dez minutos cada. Para a montagem das lâminas, empregou-se glicerina tamponada (pH 9/0,5M) e lamínula de vidro. A leitura foi realizada em microscópio de epiluminescência (marca Zeiss, modelo Axiolab).

Imunomapeamento

O fragmento de pele foi transportado em gaze umedecida com solução fisiológica a 0,9% e levado para criopreservação imediata no meio de inclusão para espécimes (*tissue freezing medium* marca Leica) e estocado no freezer a -20°C até o momento da criomicrotomia. Realizou-se a criosecção em criostato e depositaram-se quatro cortes (4μ) sobre as lâminas albuminizadas. Sobre cada corte colocou-se um dos anticorpos mono-

clonais (produzidos em camundongo), a saber, antilaminina humana (clone LAM-89, diluição de 1:20), anticolágeno IV humano (clone col-94, diluição de 1:25) e anticolágeno VII humano (clone LH7-2, diluição 1:25), todos da marca Sigma Aldrich, adquiridos comercialmente. Como fonte de anticorpos contra o antígeno do penfigoide bolhoso, utilizou-se o soro de um paciente com essa patologia previamente diagnosticada (diluição 1:20). As diluições foram feitas em TBS pH 7,5. Cada um dos anticorpos diluídos foi depositado num corte e incubado por um período de 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Findo esse prazo, as lâminas foram lavadas em TBS por dois períodos de 10 minutos cada. A seguir, para se revelar a reação, empregou-se o anticorpo anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína. Para a ligação aos anticorpos monoclonais, utilizou-se uma IgG anticamundongo (diluição 1:30) produzida em coelho [*mouse immunoglobulins / FITC-rabbit F (ab')₂*, marca Dako] e, para a ligação ao anticorpo do antígeno do penfigoide, utilizou-se uma IgG anti-humana (diluição 1:130), também produzida em coelhos (*anti-Human IgG-Whole molecule-FITC conjugate*, marca Sigma Aldrich). As diluições foram realizadas em tampão TBS contendo 3mg% do corante Azul de Evans. Após 30 minutos de incubação (em câmara úmida e temperatura ambiente), as lâminas foram novamente lavadas em TBS por dois períodos de 10 minutos cada. Depois de levemente secas, elas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula de vidro e a leitura foi feita em microscópio de epiluminescência.

RESULTADOS

Selecionaram-se 28 pacientes com PCT antes e depois do tratamento com cloroquina. Sete foram do sexo feminino (25%) e 21, do sexo masculino (75%). A idade média foi de 30,3 anos (mediana de 29,0 anos) para as mulheres e de 44,5 anos (mediana de 49 anos) para os homens. A ingestão de álcool foi o fator desencadeante predominante nos homens e, nas mulheres, a terapia com estrógeno (anticoncepção e reposição hormonal). A hepatite C esteve presente em 57,1% do total dos pacientes (71,4% dos homens e 14,3% das mulheres). Não houve relato de exposição a hidrocarbonetos policlorados porfirinogênicos. Outras doenças presentes foram hepatite B (39,3%), diabetes *mellitus* (17,9%), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV (7,1%), insuficiência renal crônica (3,6%), carcinoma hepatocelular (3,6%), mieloma múltiplo (3,6%) e mielofibrose (3,6%). Todos os pacientes foram tratados com difosfato de cloroquina (250mg, duas vezes por semana), exceto um, tratado com flebotomia.

As biópsias foram realizadas em três fases diferentes. Fase A antes de iniciar o tratamento, fase B durante o tratamento com cloroquina e em remissão clínica, porém sem remissão bioquímica, e fase C em remissão clínica e bioquímica, ou seja, porfiria inativa (Figura 1).

Microscopia óptica

Nos pacientes com PCT ativa (Fase A), a microscopia óptica com a coloração de hematoxilina-eosina revelou bolha subepidérmica em 86,9% (20 de 23 pacientes), sendo que 47,8% (11 de 23) apresentavam papilas dérmicas armadas estendendo-se irregularmente a partir da base da bolha para dentro da cavidade com aspecto de festonamento (Figura 2). Infiltrado inflamatório linfomononuclear perivascular foi encontrado ocasionalmente. Nenhuma fibrose foi observa-

da, exceto na lesão esclerodermoide de um paciente em quem a derme apresentava fibras de colágeno espessadas e dispostas de forma mais compacta.

Na coloração com ácido periódico-Schiff (PAS) da pele lesada de 95,6% dos pacientes (22 de 23) (Fase A), os vasos da derme superior apresentavam espessamento homogêneo da parede dos vasos por material hialino PAS-positivo e diastase-resistente (Figura 2). Esse espessamento da parede vascular manteve-se em 92,9% dos pacientes (13 de 14) com a pele clinicamente normal (Fases B e C). As alterações vasculares eram mais acentuadas na derme papilar e a quantidade de material hialino em torno dos vasos variava nas diferentes biópsias. Em cinco pacientes foi possível comparar o espessamento da parede vascular antes do tratamento (Fase A) e na remissão bioquímica (Fase C). Eles apresentavam espessamento do vaso ao PAS antes do tratamento e, na remissão bioquímica, quatro deles apresentavam espessamento mais leve e um não apresentava espessamento da parede (Quadro 1). Desconhece-se o período em que dois pacientes (casos 20 e 21) já se apresentavam em remissão bioquímica quando realizaram a segunda biópsia (após dez e seis anos, respectivamente); quanto aos outros três pacientes, tiveram a segunda biópsia realizada logo que entraram em remissão bioquímica.

Todas as amostras (Fases A, B e C) foram submetidas à coloração de Perls, mas não se identificou depósito de hemossiderina na derme.

Imunofluorescência direta (IFD)

Na porfiria ativa (Fase A), a IFD demonstrou fluorescência característica homogênea e intensa no interior e na parede dos vasos e na junção dermoepidérmica (Figura 3). No quadro 2 estão descritos os resultados da IFD de cada paciente nas diferentes fases (A, B e C). Na Fase A, quatro pacientes apresen-

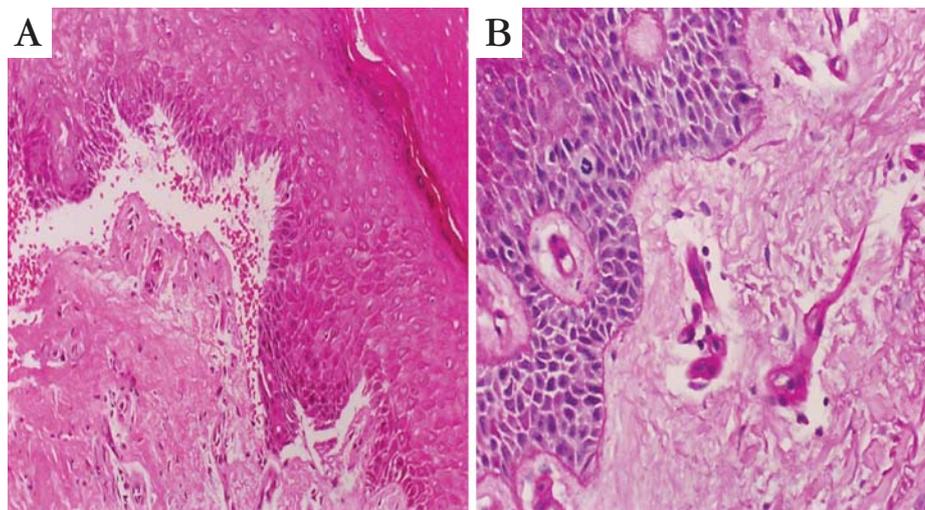


FIGURA 2: Porfiria cutânea tardia: A. Histopatologia com a coloração hematoxilina-eosina mostrando uma bolha subepidérmica com papilas dérmicas armadas e sem infiltrado inflamatório (HE, 40x). B. Coloração de ácido periódico-Schiff (PAS) revelando material hialino PAS-positivo diastase-resistente espessando a parede dos vasos dérmicos (PAS, 40x)

QUADRO 1: Intensidade do espessamento da parede vascular por material hialino PAS-positivo diastase-resistente (intenso, moderado ou leve), antes do tratamento (porfiria ativa) e depois da remissão bioquímica, além do tempo de tratamento após o qual foi feita a segunda biópsia

N.º do caso	Biópsia antes do tratamento	Biópsia com remissão Bioquímica	Tempo de tratamento
4	Moderado	Leve	18 meses
13	Intenso	Leve	28 meses
16	Intenso	Leve	16 meses
20	Intenso	Leve	10 anos
21	Moderado a leve	Sem espessamento	6 anos

NOTA: O número do caso descrito neste quadro é o mesmo utilizado para descrever esses pacientes no Quadro 2.

taram a IFD negativa e 19 apresentaram imunofluorescência com depósitos de IgG e de C3 nos vasos (65,2% e 52,2%, respectivamente) e na JDE (47,8% e 39,1%, respectivamente) (Quadro 3). A fluorescência nos vasos por IgG era moderada em quatro pacientes (17,4%) e intensa em nove (39,1%); por C3, era moderada em quatro (17,4%) e intensa em seis (26,1%). O depósito era mais proeminente nos vasos papilares, mas os vasos da derme reticular também estavam envolvidos com frequência. Na JDE, a fluorescência era focal ou contínua e apresentava padrão granular ou homogêneo.

Na Fase B, o depósito de IgG na parede dos vasos ocorreu em 85,7% dos sete pacientes testados, sendo que três (42,9%) eram de intensidade moderada e dois (28,6%) apresentavam fluorescência intensa. O depósito de C3 nos vasos estava presente somente em um caso (14,3%), mas com fluorescência discreta.

Na porfiria inativa (Fase C), a imunofluorescência foi negativa em um caso e o depósito de IgG ocorreu na parede dos vasos de 87,5% dos oito pacientes testados, sendo que três (37,5%) apresentavam fluorescência de intensidade moderada e quatro (50,0%), fluorescência intensa. Nessa fase, o depósito de C3 estava presente em 37,5% (três de oito) e a intensida-

de da fluorescência era discreta, moderada e intensa em cada um dos três casos (12,5% cada).

Comparando-se os pacientes com doença ativa (Fase A) com os pacientes em remissão clínica (Fases B e C), o número de casos com depósito de IgG na parede dos vasos aumentou: de 65,2% (IC 95% [42,7; 83,6]), na Fase A, para 85,7% (IC 95% [42,1; 99,6]) e 87,5% (IC 95% [47,3; 99,7]) nas Fases B e C, respectivamente) e não houve diminuição na intensidade da fluorescência. Já o número de casos com depósito de complemento (C3) nos vasos diminuiu: de 52,2% (IC 95% [30,6; 73,2]), na Fase A, para 14,3% (IC 95% [0,4; 57,9]) e 37,5% (IC 95% [8,5; 75,5]) nas Fases B e C, respectivamente, e apresentaram diminuição na intensidade da fluorescência. Essa diminuição de C3 foi importante, sendo mais significativa para os pacientes na Fase B ($p = 0,089$) do que para os pacientes na Fase C ($p = 0,382$). Ao observar se essa diminuição foi significativamente diferente entre as Fases B e C, nada se constatou ($p = 0,338$).

Considerando-se os pacientes que apresentavam a IFD positiva (Quadro 2) na Fase A, 57,9% (11 de 19) demonstravam a intensidade da fluorescência na parede dos vasos tão notável quanto a da JDE e 31,6% (seis de 19) mostravam fluorescência mais intensa na parede

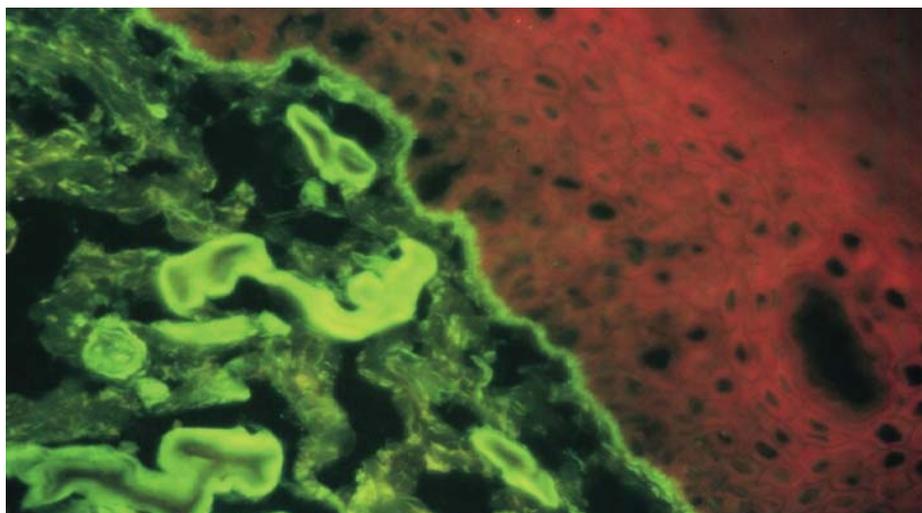


FIGURA 3: Porfiria cutânea tardia: Imunofluorescência direta demonstrando fluorescência característica homogênea e intensa no interior e na parede dos vasos e na junção dermoepidérmica para anti-IgG (40x)

QUADRO 3: Achados da imunofluorescência direta: número de casos com depósito de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA e de complemento (C3) na junção dermoepidérmica (JDE) e nos vasos

Diagnóstico clínico	Nº. de casos	IgG		IgM		IgA		C3	
		JDE %	Vasos %	JDE %	Vasos %	JDE %	Vasos %	JDE %	Vasos %
Fase A: PCT ativa antes do tratamento	23	11 (47,8)	15 (65,2)	7 (30,4)	9 (39,1)	6 (26,1)	9 (39,1)	9 (39,1)	12 (52,2)
Fase B: PCT com remissão clínica e não bioquímica	7	2 (28,6)	6 (85,7)	3 (42,9)	2 (28,6)	1 (14,3)	4 (57,1)	1 (14,3)	1 (14,3)
Fase C: PCT com remissão clínica e bioquímica	8	3 (37,5)	7 (87,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50,0)	2 (25,0)	3 (37,5)

dos vasos do que na JDE. Quanto aos pacientes com remissão clínica da Fase B, 42,9% (três de sete) demonstravam a intensidade da fluorescência na parede dos vasos tão notável quanto a da JDE e 57,1% (quatro de sete) demonstravam a fluorescência mais intensa na parede dos vasos do que na JDE. Os pacientes com PCT inativa da Fase C (28,6% - dois de sete) demonstravam a intensidade da fluorescência dos vasos equivalente à da JDE e 71,4% dos pacientes (cinco de sete) demonstravam fluorescência mais intensa na parede dos vasos do que na JDE. Observou-se que a fluorescência passa a ser mais proeminente na parede dos vasos do que na JDE à medida que o paciente passa da porfiria ativa (Fase A) para a remissão clínica (Fase B) e, depois, para a remissão bioquímica (Fase C).

Imunomapeamento antigênico

Realizou-se o imunomapeamento antigênico para determinar o nível de clivagem em sete pacientes com PCT ativa (Quadro 4). Em três casos, todos os antígenos (antígeno do penfigoide bolhoso, a lamina, o colágeno tipo IV e o colágeno tipo VII) foram encontrados nos dois lados da bolha e não apresentaram nível de clivagem definido. Dois casos apresentaram todos os antígenos na base da bolha, portanto, a clivagem foi intraepidérmica. Em um caso, o colágeno IV foi encontrado no teto e o colágeno VII, em ambos os lados da bolha, sendo a clivagem, portanto, no nível da sublâmina densa; em outro, todos os antígenos foram encontrados no teto da bolha; consequentemente, a clivagem ocorreu abaixo da sublâmina densa (Figura 4). Não houve, assim, um padrão característico no nível de clivagem.

DISCUSSÃO

Neste estudo, as características clínicas dos pacientes assemelham-se aos da literatura,⁸ que enfatizam

o predomínio em homens e o álcool como o principal fator desencadeante. A associação com HCV, hepatite B, diabetes *mellitus*, HIV, insuficiência renal crônica, carcinoma hepatocelular, mieloma múltiplo e mielofibrose foi consistente com estudos anteriores.⁸⁻¹² Detectou-se uma frequência alta de HCV, mas seu papel patogênico no desencadeamento da PCT ainda não foi elucidado. Cloroquina em baixas doses foi o tratamento de escolha e seus efeitos benéficos já foram enfatizados em diversos relatos.^{13,14}

A coloração pelo PAS revelou na parede dos vasos da derme superior depósito de material PAS-positivo e diastase-resistente em 95,6% dos casos, como já foi visto em outros trabalhos.¹⁵ Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que esse material hialino é composto por múltiplas camadas da lâmina basal e alargamento dos espaços perivasculares com fibras colágenas finas e dispersas por pequena quantidade de material filamentar e amorfo.^{2,16} A reação imunoistoquímica para colágeno tipo IV e a técnica de imunofluorescência, empregando soro anticolágeno tipo IV e antilaminina, comprovaram que esse material perivascular resulta do excesso na síntese de membrana basal.¹⁷ Os depósitos hialinos seriam uma resposta decorrente de episódios repetidos de lesão à parede vascular com vazamento do seu conteúdo.¹⁸ Estudos histoquímicos indicaram que os depósitos hialinos contêm triptofano, que é derivado do sangue e não é encontrado no colágeno ou no tecido elástico.¹⁹ Esses estudos sugerem, portanto, que o material hialino amorfo deriva da parede e do conteúdo vascular. A JDE apresenta alterações estruturais idênticas às descritas nos vasos.^{2,16} Os vasos da pele não exposta são de espessura normal.^{15,16}

Nas Fases B e C, o material hialino PAS-positivo na parede do vaso manteve-se em 92,9% dos pacientes. Timonen et al.¹⁵ acreditavam que o espessamento

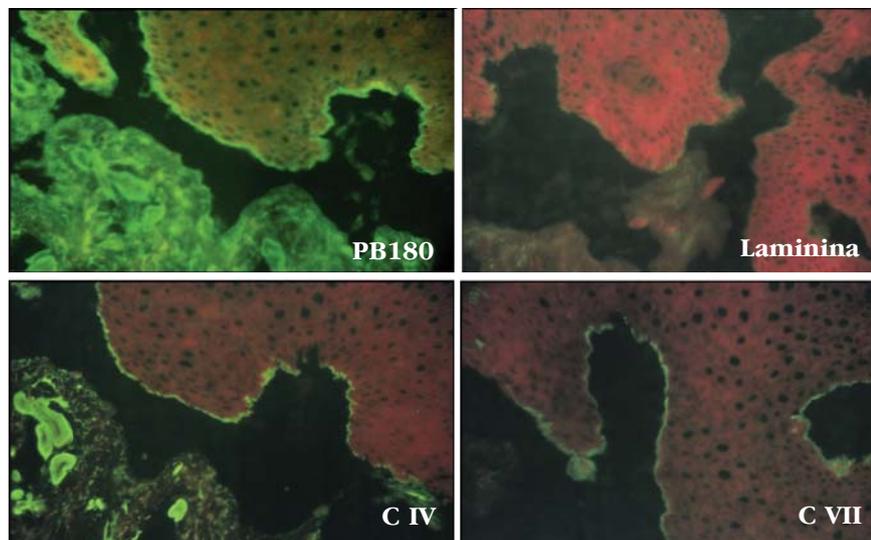


FIGURA 4: Porfiria cutânea tardia - Imunomapeamento antigênico da membrana basal com todos os antígenos, o antígeno do penfigoide bolhoso (PB180), a laminina, o colágeno IV e o colágeno VII, do lado epidérmico e, desse modo, com o nível da clivagem na derme superior abaixo da sublâmina densa (40x)

da parede vascular seria uma alteração crônica e irreversível. Entretanto, Epstein et al.¹⁶ demonstraram que a hialinização vascular era mais pronunciada na pele lesada de pacientes com porfiria ativa do que na pele exposta de pacientes com porfiria inativa, mas não compararam as biópsias, antes e depois do tratamento, no mesmo paciente, de modo que essa diminuição da hialinização da parede dos vasos poderia ser em razão de os pacientes com a PCT inativa apresentarem alterações vasculares mais discretas na fase ativa ou de o período de remissão ser longo e as alterações vasculares melhorarem durante esse período. Entre os cinco pacientes do presente estudo (Quadro 1), há diminuição desse depósito após a remissão bioquímica, mas falta uma casuística maior e um período mais longo de acompanhamento após a remissão bioquímica para se chegar a uma conclusão definitiva.

O estudo da imunofluorescência na PCT foi realizado pela primeira vez por Baart de la Faille-Kuyper e Cormane em 1968, utilizando conjugados poliespecíficos sem especificidade imunológica.²⁰ Cormane et al.,¹ em 1971, com a melhoria do equipamento microscópico (diminuição da autofluorescência das fibras colágenas), detectaram imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) e depósitos de complemento no interior e na parede dos vasos e na JDE; eles sugerem a existência de uma via alternativa que ativa a sequência do complemento, induzida por reação fotodinâmica e independente de reações imunológicas. Epstein et al.,¹⁶ em 1973, demonstraram a IgG, e o complemento de forma esporádica, na parede dos vasos e na JDE da pele lesada de pacientes com PCT ativa. Já nos pacientes com PCT inativa, a fluorescência apresentava-se com menor intensidade na pele exposta e ausente na pele protegida da luz, indicando que a luz e as porfirinas eram essenciais para produzir a lesão. Timonen et al.,¹⁵ em 1991, estudaram a IFD antes e

depois do tratamento com cloroquina em quatro pacientes: antes do tratamento, IgG estava presente na parede vascular em três deles e o complemento, em um. Após a remissão, o depósito de IgG era menos intenso (dois), aumentado (um) ou negativo (um). Seis a doze meses após a remissão bioquímica, depósitos intensos de IgG foram encontrados em dois pacientes, sendo que, em um deles, nenhum depósito de IgG havia sido observado antes do tratamento.

Os resultados da IFD confirmam estudos prévios, pois revelam depósitos de IgG e C3, além de IgA e IgM, produzindo fluorescência característica que se estende da parede à luz do vaso e na JDE da pele lesada de 18 pacientes com PCT ativa (cinco apresentaram IFD negativa). Na maioria dos pacientes com PCT ativa, a fluorescência era homogênea e muito intensa. Os pacientes com remissão clínica (Fase B) e com remissão bioquímica (Fase C) mantêm, na pele exposta, o depósito de IgG na parede vascular e na JDE e não se observou diminuição na intensidade da fluorescência em relação à observada na PCT ativa. Após o tratamento, o depósito de Ig se mantém, apesar de os níveis de porfirinas estarem normais e, portanto, não haver absorção de luz para produzir lesão vascular. Vários autores consideram que esses depósitos não são resultado de um fenômeno imunológico, pois não se identificaram autoanticorpos circulantes contra antígenos vasculares, perivascularares ou da JDE.^{2,16,21} Supõe-se que os depósitos de imunoglobulinas (Igs) sejam resultado da difusão, pela parede vascular, de Igs circulantes e seu enclausuramento no material hialinizado perivascular.^{2,21} O mesmo não ocorreu com o depósito de C3, que, nas Fases B e C, apresentou diminuição importante no número de casos com depósito nos vasos (de 52,2% na Fase A para 14,3% e 37,5% nas Fases B e C, respectivamente) e na intensidade da fluorescência. Esse decréscimo foi importan-

QUADRO 4: Imunomapeamento antigênico da junção dermoepidérmica e o nível de clivagem da bolha

Nº. de casos	ANTÍGENOS	NÍVEL DE CLIVAGEM DA BOLHA
3	Todos os antígenos do lado epidérmico e dérmico	Sem nível de clivagem definido (bolha em regeneração)
1	Antígenos do penfigoide bolhoso e laminina foram negativos; o colágeno IV foi encontrado no lado epidérmico e o colágeno VII, no lado epidérmico e dérmico	Sublâmina densa
1	Todos os antígenos no lado epidérmico	Derme superior (abaixo da sublâmina densa)
1	Todos os antígenos no lado dérmico da bolha	Intraepidérmico (células basais)
1	Todos os antígenos no lado dérmico da bolha	Intraepidérmico (acima das células basais)

te, mas não estatisticamente significativo ($p = 0,089$ e $p = 0,382$, respectivamente). Possivelmente o complemento esteja envolvido na patogênese da lesão. São várias as evidências de que o complemento estaria envolvido: (1) a radiação *in vitro* do soro de pacientes com PCT resulta na ativação do complemento;^{22,23} (2) a fotossensibilidade induzida por porfirinas, em modelos animais, está associada à ativação do complemento e está suprimida em animais com depleção do complemento ou deficiência congênita de C5;²⁴ (3) observou-se atividade quimiotática induzida pelo C5 após a exposição da pele de pacientes com PCT à irradiação na banda de Soret.²⁵ Acredita-se que as porfirinas e a luz ativem a via alternativa da cascata do complemento, independentemente de reações imunológicas, levando à lesão endotelial.¹ Presume-se que a ativação do complemento, mediada pelas porfirinas após a radiação da luz, resultaria da geração de fatores reatores do oxigênio, mais provavelmente, o oxigênio *singlet*.²⁵ Não se estabeleceu de forma clara se a lesão endotelial se segue à ativação da cascata do complemento ou se as duas ocorrem de forma independente.²

Quanto aos depósitos na JDE, provavelmente possuam a mesma origem dos depósitos na parede vascular, já que não se identificaram anticorpos circulantes contra a JDE e as imunoglobulinas são equivalentes às encontradas nos vasos.² À medida que o paciente evolui de porfiria ativa para remissão clínica e, posteriormente, para remissão bioquímica, a fluorescência passa a predominar mais na parede dos vasos do que na JDE. O que se pode concluir com base nesses dados é que as porfirinas que levam à lesão endotelial fazem com que, na fase ativa (Fase A), o vazamento de imunoglobulinas (Igs) e complemento (C3) seja maior e, portanto, a fluorescência na JDE seja mais frequente. Já na remissão clínica (Fase B) e na remissão bioquímica (Fase C) há uma diminuição da fluorescência na JDE, provavelmente, porque o vazamento das Igs e de C3 é menor e fica mais restrito à área perivascular.

Apesar de as alterações histopatológicas e imunofluorescência sugerirem que o foco primário da lesão cutânea é a parede vascular, a patogênese da fragilidade cutânea e da formação de bolhas ainda não pôde ser definitivamente elucidada. As bolhas podem ser induzidas por fricção,² mas não com a mesma frequência por fototeste.²⁶ As imunoglobulinas depositadas na JDE não podem ser responsabilizadas pela fragilidade, pois também ocorrem na Protoporfiria Eritropoiética (PPE) e esta não apresenta bolha.² Outra evidência de que as imunoglobulinas não são responsáveis pela fragilidade e formação das bolhas é a sua presença na JDE da pele normal de pacientes com PCT inativa. As alterações na microscopia eletrônica da JDE são encontradas somente nos pacientes com PCT e Porfiria Variegata (PV);¹⁶ essa diferença pode estar relacionada à concentração e à solubilidade das porfirinas envolvidas. Na PPE, a protoporfirina está presente em grandes quantidades dentro dos vasos sanguíneos e, como não é hidrossolúvel, não se difunde facilmente para fora do vaso. Isso explica por que, nessa condição, a lesão vascular é mais acentuada do que as alterações na JDE.¹⁶ Na PCT, as bolhas resultam de clivagem variável, ora na lâmina lúcida,^{3,27,28} ora na derme papilar,^{2,15,29} ora no nível dos queratinócitos basais que mostram alterações degenerativas.³⁰ Em alguns pacientes, os três tipos de clivagem podem ser observados em diferentes biópsias, ou até na mesma biópsia.³⁰ Alguns autores acreditam que a bolha se origine, inicialmente, na zona juncional e depois, com estímulo adicional, rapidamente se torne uma bolha de clivagem dérmica, o que explicaria a ocorrência de cicatriz.²⁸ Outros autores apresentam a hipótese de que o paciente com PCT tem a pele exposta tão rígida que não tolera fricção ou trauma.² Reforçando essa hipótese, observaram experimentalmente, nos pacientes com PCT ativa, que a pele exposta com aspecto clínico normal apresentava, na microscopia eletrônica, a formação

de clivagem. Esta se forma abaixo da lâmina basal nas camadas superficiais da derme e as reduplicações da membrana basal resultam, provavelmente, de múltiplos episódios de clivagem microscópica e sua subsequente regeneração.²

Outro estudo do evento morfológico de formação da bolha, com a microscopia eletrônica, demonstrou que o fenômeno é condicionado pela formação de vacúolos limitados por membrana; estes são observados na derme superficial, em torno dos vasos e imediatamente abaixo da lâmina basal.²⁹ A irradiação das porfirinas concentradas nos lisossomos¹⁹ levaria à lesão fotodinâmica das membranas lisossomais, fazendo com que as enzimas escapassem para o citoplasma e a célula sofresse apoptose. Os vacúolos formados pela citólise das células dérmicas e a ruptura das membranas vacuolares causariam a clivagem dermoepidérmica. A lesão lisossomal também pode comprometer as células endoteliais e os queratinócitos da camada basal. Outra sugestão desses autores que explicaria o desenvolvimento da bolha seria a formação de pseudópodes das células da camada basal protraindo pelos espaços na membrana basal para a derme.²⁹ Esse fenômeno degenerativo nas células basais explicaria por que alguns autores afirmam que a bolha pode ocorrer acima da membrana basal.^{3,27,28,30} Eles concluem que a clivagem é consequência da lesão fotodinâmica dos lisossomos, comprometendo células endoteliais, células dérmicas e queratinócitos da camada basal.²⁹

No presente estudo, utilizou-se o imunomapeamento antigênico para determinar o nível da clivagem da bolha em sete pacientes. Em três deles não foi possível identificar o nível de clivagem, pois apresentavam todos os antígenos do lado epidérmico e dérmico da bolha, tratando-se, provavelmente, de bolhas em regeneração; em dois pacientes, a clivagem foi intraepidérmica; em outro, a clivagem foi na sublâmina densa; em outro paciente, a clivagem ocorreu abaixo da sublâmina densa. Não foi encontrado, portanto, um único nível de clivagem, o que concorda com as descobertas de diversos autores que encontraram nível de clivagem variável na microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

1. Cormane RH, Szabò E, Hoo TT. Histopathology of skin in acquired and hereditary porphyria cutanea tarda. *Br J Dermatol.* 1971;85:531-9.
2. Wolff K, Hönigsmann H, Rauschmeier W, Schuler G, Pechlaner R. Microscopic and fine structural aspects of porphyrias. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1982;100:17-28.
3. Dabski C, Beutner EH. Studies of laminin and type IV collagen in blisters of porphyria cutanea tarda and drug-induced pseudoporphyria. *J Am Acad Dermatol.* 1991;25(1 Pt 1):28-32.
4. Burgeson RE, Christiano AM. The Dermal-epidermal Junction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:651-8.
5. Magnus IA. *Dermatological Photobiology. Clinical and*

Apenas dois estudos utilizaram o imunomapeamento da JDE para determinar o nível de clivagem da bolha: um de cinco bolhas grandes, no qual quatro foram juncionais e uma foi de clivagem dérmica,²⁷ e outro com cinco casos de PCT e dois de pseudoporfiria, onde se observou a clivagem na lâmina lúcida (juncional) nos sete casos.³ Outros autores^{2,15} acreditam que a diferença entre as clivagens encontradas na microscopia eletrônica e no imunomapeamento se deve a um problema de amostragem, ou seja, ao tamanho das bolhas. Na microscopia eletrônica, descreveu-se clivagem na derme superior, pois nesta são necessárias vesículas pequenas e recentes. As vesículas pequenas seriam de clivagem dérmica e as bolhas grandes seriam juncionais. A vantagem do imunomapeamento sobre a microscopia eletrônica é que permite a análise de uma área maior da clivagem, ou seja, de uma bolha inteira e maior.²⁷ A bolha juncional não pode ser considerada uma característica morfológica específica decorrente de mecanismo patológico específico, pois pode ser um fenômeno secundário resultante da formação da bolha dérmica, cujo conteúdo fluido extravasa e separa a lâmina basal ao nível da lâmina lúcida, pois essa região atua como um *locus minoris resistentiae*.²⁷ Diferentemente dos demais trabalhos que utilizaram o imunomapeamento da JDE para estudar o nível de clivagem da bolha, não se obteve, aqui, nenhum caso de clivagem ao nível da lâmina lúcida. Os achados deste estudo estão mais de acordo com os da microscopia eletrônica, em que os níveis de clivagem foram variáveis.

CONCLUSÃO

Este estudo contribui para o conhecimento da fisiopatologia das lesões cutâneas na PCT. Observou-se que os depósitos de imunoglobulinas não apresentam relação com a fragilidade e a formação de bolhas, mas a diminuição do depósito de complemento na remissão bioquímica favorece a hipótese de que a ativação da cascata do complemento representa uma via adicional que leva à lesão endotelial. Já o mecanismo mais provável que define os diferentes níveis de clivagem na JDE se deve ao fato de a lesão fotodinâmica dos lisossomos acometerem diferentes células-alvo, os queratinócitos basais e/ou as células dérmicas. □

- Experimental Aspects. Appendix II - Clinical Screening tests for excess porphyrins. London: Blackwell Scientific Publications; 1976. p.253-5.
6. Bickers DR, Pathak MA. The porphyrias. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds. *Dermatology in General medicine*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1993. p.1854-93.
 7. Lim CK, Peters TJ. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin Chim Acta*. 1984;139:55-63.
 8. Vieira FMJ, Martins JEC. Porfiria cutânea tardia. *An Bras Dermatol*. 2006;81:573-84.
 9. Roengkh HH Jr, Gottlob ME. Estrogen-induced porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol*. 1970;102:260-6.
 10. Chuang TY, Brashear R, Lewis C. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C virus: A case-control study and meta-analysis of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41:31-6.
 11. Mansourati FF, Stone VE, Mayer KH. Porphyria cutanea tarda and HIV/AIDS: a review of pathogenesis, clinical manifestations and management. *Int J STD AIDS*. 1999;10:51-6.
 12. Fracanzani AL, Taioli E, Sampietro M, Fatta E, Bertelli C, Fiorelli G, et al. Liver cancer risk is increased in patients with porphyria cutanea tarda in comparison to matched control patients with chronic liver disease. *J Hepatol*. 2001;35:498-503.
 13. Kordac V, Papezová R, Semrádová M. Chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda. *N Eng J Med*. 1977;296:949.
 14. Freesemann A, Frank M, Sieg I, Doss MO. Treatment of porphyria cutanea tarda by the effect of chloroquine on the liver. *Skin Pharmacol*. 1995;8:156-61.
 15. Timonen K, Niemi KM, Mustajoki P. Skin morphology in porphyria cutanea tarda does not improve despite clinical remission. *Clin Exp Dermatol*. 1991;16:355-8.
 16. Epstein JH, Tuffanelli DL, Epstein WL. Cutaneous changes in the porphyrias: A microscopic study. *Arch Dermatol*. 1973;107:689-98.
 17. Wick G, Hönigsmann H, Timpl R. Immunofluorescence demonstration of type IV collagen and a noncollagenous glycoprotein in thickened vascular basal membranes in protoporphyria. *J Invest Dermatol*. 1979;73:335-8.
 18. Hönigsmann H, Gschnaiat F, Konrad K, Stingl G, Wolff K. Mouse model for protoporphyria. III. Experimental production of chronic erythropoietic proto porphyria-like skin lesions. *J Invest Dermatol*. 1976; 66:188-95.
 19. Ryan EA. Histochemistry of the skin in erythropoietic protoporphyria. *Br J Dermatol*. 1966;78:501-18.
 20. Baart de la Faille-Kuypp, Cormane RH. The occurrence of certain serum factors in the dermal-epidermal junction and vessel walls of the skin in lupus erythematosus and other (skin) diseases. *Acta Derm Venereol*. 1968;48:578-88.
 21. Krajnc I, Vizjak A, Hvala A, Jurcic V, Rozman B. The significance of histologic analysis of skin lesions in porphyria cutanea tarda. Light microscopy, electron microscopy, immunohistochemical and immunofluorescence analysis. *Wien Klin Wochenschr*. 1998;110:651-4.
 22. Lim HW, Perez HD, Poh-Fitzpatrick M, Goldstein IM, Gigli I. Generation of chemotactic activity in serum from patients with erythropoietic protoporphyria and porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med*. 1981;304:212-6.
 23. Torinuki W, Miura T, Tagami H. Activation of complement by 405-nm light in serum from porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol Res*. 1985;277:174-8.
 24. Lim HW, Gigli I. Role of complement in porphyrin-induced photosensitivity. *J Invest Dermatol*. 1981;76:4-9.
 25. Lim HW, Poh-Fitzpatrick MB, Gigli I. Activation of the complement system in patients with porphyrias after irradiation in vivo. *J Clin Invest*. 1984;74:1961-5.
 26. Rimington C, Magnus IA, Ryan EA, Cripps DJ. Porphyria and photosensitivity. *Q J Med*. 1967;36:29-57.
 27. Klein GF, Hintner H, Schuler G, Fritsch P. Junctional blisters in acquired bullous disorders of the dermal-epidermal junction zone: role of the lamina lucida as the mechanical locus minoris resistentiae. *Br J Dermatol*. 1983;109:499-508.
 28. Nagato N, Nonaka S, Ohgami T, Murayama F, Yamashita K, Irifune H, et al. Mechanism of blister formation in porphyria cutanea tarda. I. Histopathological observation of blisters in three cases of porphyria cutanea tarda. *J Dermatol*. 1987;14:551-5.
 29. Caputo R, Berti E, Gasparini G, Monti M. The morphologic events of blister formation in porphyria cutanea tarda. *Int J Dermatol*. 1983;22:467-72.
 30. Perrot H, Schmitt D, Thivolet J, Leung J, Germain DU. Étude ultrastructurale de la bulle dans les porphyries cutanées hépatiques. *Bull Soc Fr Derm Syph*. 1972;79:12-8.

MAILING ADDRESS / ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Fátima Mendonça Jorge Vieira

Rua Voluntários da Pátria, 4.370 – Conj. 121 – Santana

02402-600 São Paulo - SP - Brasil

Tel./Fax: (11) 2281-8712 / 2978-5090

E-mail: fmjvieira@hotmail.com

How to cite this article/Como citar este artigo: Vieira FMJ, Aoki V, Oliveira ZNP, Martins JEC. Estudo da imunofluorescência direta, imunomapeamento e microscopia ótica na porfiria cutânea tardia. *An Bras Dermatol*. 2010;85(6):827-37.