



CRISTINA GEVEHR FERNANDES

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PATOGENIA
DE UMA GENODERMATOSE MECANOBOLHOSA
EM BÚFALOS MURRAH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, área de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Viciany E. Fabris

BOTUCATU
2001

Fernandes, Cristina Gevehr

Contribuição ao estudo da patogenia de uma genodermatose mecanobolhosa em búfalos Murrah / Cristina Gevehr Fernandes. – 2001.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.

Orientador: Viciany Erique Fabris

1. Búfalo – Doenças – Patogênese

CDD 636.208916

Palavras-chave: Búfalos; Dermatoses vésico-bolhosas; Epidermólises; Desmossomos.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu esposo Sérgio Leal Fernandes. Mesmo não sendo da área, seus questionamentos e opiniões produziram reflexões que contribuíram para este trabalho. Além disso, seu carinho, apoio e auxílio efetivo, por vezes colocando “a mão na massa”, também foram cruciais. Enfim, ele foi e é um companheiro e tanto!

Ao meu bebê, que ainda está por vir, mas cujo anúncio da chegada já me trouxe a felicidade e serenidade essenciais nesse período árduo de conclusão do trabalho.

Dedico, ainda, aos meus pais, Ademio e Marlene Gevehr e às minhas irmãs, Deise e Alexandra, que mesmo de longe sempre souberam dar as palavras de incentivo necessárias.

Agradecimentos

Sem dúvida esse é o capítulo mais difícil de redigir, pois sempre se corre o risco de omitir nomes e cometer injustiças com pessoas que certamente participaram da realização do trabalho.

Início agradecendo a Deus, não porque é de praxe e todos agradecem, mas realmente porque Nele creio e foi Nele que encontrei refúgio e sustentação nos momentos difíceis e foi através de Sua graça e misericórdia que pude comemorar os momentos felizes.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Dr. Viciany Erique Fabris, por ter me dado um voto de confiança ao assumir a minha orientação e aceitar minha a proposta de trabalho. Agradeço também por sua compreensão com problemas que porventura ocorreram durante a realização do curso e por sua atenção mesmo durante um período que lhe foi especialmente difícil, na fase de conclusão dessa Tese.

Ao pessoal do Laboratório de Imunopatologia, e de uma forma muito especial ao técnico Claudinei J. Figueira por sua boa vontade ímpar e atuação inestimável na realização dos testes de imunofluorescência.

Aos técnicos Marcos R. Franchi e Celene M. C. Gandin do Laboratório de Imuno-histoquímica pela sua presteza, disposição e amizade demonstradas durante a realização dos testes de imuno-histoquímica.

Aos técnicos Carlos C. Ramos e José C. P. de Lima, cuja participação foi fundamental na realização dos estudos de microscopia eletrônica. Agradeço também ao pessoal do Setor de Microscopia Eletrônica do IB/UNESP, em especial à Dra. Elisa A. Gregório. Devo agradecer, ainda, aos técnicos Maria L. S. Ardanaz e Paulo R. Cardoso do Toxican por terem realizado, sempre com prontidão, os cortes histológicos e a histoquímica necessários a este trabalho.

Um obrigada especial à Dra. Maria C. F. Damé, que foi a responsável pela manutenção do rebanho experimental de búfalos e uma colaboradora prestimosa deste trabalho. Agradeço também à EMBRAPA/CPACT, proprietária do rebanho e em cujas instalações ele foi mantido.

Agradecimentos ao Frigorífico Líder, de Viamão - RS, na pessoa do seu proprietário, Sr. Elmo Greve, por ter permitido a colheita de material de búfalos sadios na sua linha de abate. Agradeço também ao Prof. Dr. André Jorge Mendes por permitir e cooperar com a colheita de material dos búfalos da Fazenda Lageado-FMVZ/UNESP Botucatu. Obrigada aos professores do Departamento de Patologia da FMB/UNESP que, através de suas disciplinas ou de sua participação nas atividades do Curso/Departamento, colaboraram com a minha formação. Um agradecimento em particular à Dra. Maria A. M. Rodrigues, que sempre demonstrou um interesse especial no aprendizado dos alunos e teve uma participação fundamental no meu crescimento profissional. Obrigada também à Dra. Kunie I. R. Coelho por sua preocupação com a formação dos seus alunos e por sua tamanha dedicação à Patologia. Por fim, agradeço à Dra. Daisy M. F. Salvadori, atual coordenadora do curso, e uma incentivadora do trabalho de todos.

Agora o mais complicado, pois sei que é impossível citar todos os nomes. Quero agradecer imensamente aos meus colegas. Eles foram fonte de incentivo, risadas, aprendizado, apoio e serviram muitas vezes de “muro das lamentações”, além de

colaborar efetivamente na realização de diversas etapas do trabalho. Início agradecendo ao pessoal “morador efetivo” da nossa sala dentre os quais estão a Ana e o Luís, o Eduardo (e ampliando, sua esposa Eliana) e a Márcia Torres. Agradeço também o companheirismo de tantos outros como a Luciana, a Eliane, o Carlos, a Carla, o Deilson, o Moisés, a Márcia Dalalio e a Noeme (que já não era mais colega de curso, mas é uma grande “amiga patológica”). Perdoem-me todos aqueles cujos nomes não estão aqui citados. Saibam que lhes agradeço de coração.

Agradeço também à amiga Tânia Alice Andrade, secretária do CPG em Patologia no Departamento pela força e ajuda de todos os dias.

Obrigada a Vera L. A. Mengue, Regina C. Spadin, Nathanael P. Salles, Adnice R. P. Leme, Lilian C. N. B. Nunes que fazem parte do quadro da secretaria do CPG. Todos vocês são de uma eficiência invejável e sempre demonstraram uma enorme boa vontade para tornar os processos burocráticos mais simples para nós.

Um grande obrigada aos meus colegas do Departamento de Patologia Animal e Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da UFPel. Dentre eles à Dra. Ana Lúcia Schild, pelo seu apoio técnico e por me auxiliar na solução de inúmeras questões de ordem pessoal durante esse período de afastamento da cidade de Pelotas. Agradeço também ao Mielke, à Josiane, à Margarida e ao Riet por terem me apoiado e assumido as minhas atividades no Departamento durante a realização deste Curso e à nossa incansável secretária Zuleica Rayné. Obrigada ainda, à Tânia M. C. Machado, Chefe da Divisão de Capacitação Docente da PRPPG da UFPel.

Não posso deixar de fazer referência ainda, a alguns Mestres, no sentido mais verdadeiro do termo, os quais encontrei durante a minha formação. Dentre esses, quero fazer um agradecimento muito especial à Dra. Dominguita Lühers Graça (minha orientadora de Mestrado), que sempre foi uma grande incentivadora, e aos Drs. Severo Sales de Barros e Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) que financiou esse estudo (processo nº 98/0223) e à UFPel que junto ao Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica (PICDT) da CAPES arcaram com o ônus da minha bolsa para realização do curso.

Sumário

Lista de Figuras	8
Lista de Quadros	12
Lista de Abreviaturas	13
Introdução	14
Revisão	17
1. Complexos Juncionais.....	18
1.1. Junções Adesivas	18
1.2. Complexos Desmossomos-tonofilamentos	19
1.2.1. Desmossomos.....	19
1.2.2. Tonofilamentos	32
2. Dermatoses Vésico-bolhosas com Alterações nos Complexos Juncionais Célula-célula	33
2.1. Complexo Pênfigo.....	36
2.1.1. Aspectos Clínico-Patológicos das Formas de Pênfigo.....	36
2.1.1.1. Pênfigo Foliáceo.....	36
2.1.1.2. Pênfigo Eritematoso.....	36
2.1.1.3. Pênfigo Vulgar.....	37
2.1.1.4. Pênfigo Vegetante.....	37
2.1.1.5. Pênfigo Paraneoplásico.....	38
2.1.1.6. Pênfigo Pustular Pan-epidérmico	38
2.1.2. Antígenos.....	38
2.1.3. Etiopatogenia	40
2.2. Doença de Darier	42
2.3. Doença de Hailey-Hailey.....	43
2.4. Acantólise Familiar dos Bovinos Angus	45
2.5. Queratoderma Palmoplantar Hereditário	45
2.6. Síndrome da Fragilidade da Pele/Displasia Ectodérmica.....	45
2.7. Genodermatose Mecanobolhosa em Búfalos Murrah	47
Material e Métodos.....	49
1. Rebanho Experimental de Portadores da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah.....	50
2. Estudo da Patogenia da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah	57
2.1. Colheita do Material dos Búfalos Portadores e Controles.....	57
2.2. Imunofluorescência Direta	59
2.2.1. Produção do Conjugado Anti-IgG de Búfalo e ITCFO	59
2.2.1.1. Purificação da IgG de Búfalo	59
2.2.1.2. Produção de Anti-IgG de Búfalo em Coelhos.....	60
2.2.1.3. Teste da Anti-IgG de Búfalo Produzida em Coelho.....	62
2.2.1.4. Produção do Conjugado de Anti-IgG com ITCFO	62
2.2.2. Teste de Imunofluorescência Direta	62
2.3. Imuno-Histoquímica ¹	62

2.3.1. Pesquisa de Auto-anticorpos com Anticorpos Anti-imunoglobulinas de Bovinos.....	62
2.3.2. Avaliação da Distribuição das Proteínas Desmossômicas	63
2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão	63
Resultados.....	65
1. Achados no Rebanho Experimental de Búfalos Murrah	66
2. Estudo da Patogenia da dermatose hereditária dos búfalos	73
2.1. Testes de Imunofluorescência Direta	73
2.1.1. Teste de Imunofluorescência Direta para Pesquisa das Frações C1 e C3 do Complemento.....	73
2.1.2. Teste de Imunofluorescência Direta para Pesquisa de Auto-anticorpos	74
2.1.2.1. Pesquisa de Auto-anticorpos com Conjugados Comerciais	75
2.1.2.2. Pesquisa de Auto-anticorpos com Anti-IgG de Búfalo.....	75
2.2. Estudos de Imuno-Histoquímica	76
2.2.1.1. Pesquisa de Auto-anticorpos com Anticorpos Comerciais Anti-Imunoglobulinas de Bovinos.....	77
2.2.1.2. Avaliação da Distribuição das Proteínas Desmossômicas	77
2.2.1.2.1. Desmoplaquina	77
2.2.1.2.2. Desmogleína	82
2.3. Avaliação pela Microscopia Eletrônica de Transmissão	82
2.3.1. Animais Controle: Pele Normal	82
2.3.1.1. Complexos Juncionais.....	82
2.3.1.1.1. Hemidesmossomos	82
2.3.1.1.2. Desmossomos	82
2.3.1.2. Estrato Basal	83
2.3.1.3. Estrato Espinhoso	84
2.3.1.4. Estrato Granuloso	85
2.3.1.5. Estrato Córneo.....	85
2.3.2. Animais Portadores da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah	87
2.3.2.1. Complexos Juncionais.....	87
2.3.2.1.1. Junção Dermo-Epidérmica	87
2.3.2.1.2. Desmossomos	87
2.3.2.2. Estrato Basal	87
2.3.2.3. Estrato Espinhoso	92
2.3.2.4. Estratos Granuloso e Córneo.....	94
Discussão	96
1. Considerações sobre o Padrão de Herdabilidade da Genodermatose Mecanobolhosa e sua Incidência no Rebanho Experimental.....	97
2. Estudo a Patogenia da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah	98
2.1. Imunofluorescência Direta	98
2.2. Imuno-Histoquímica.....	100
2.2.1. Pesquisa de Auto-anticorpos com Anti-Imunoglobulinas de Bovinos.....	100
2.2.2. Avaliação da Distribuição das Proteínas Desmossômicas	101
2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão	102

3. Considerações Finais sobre a Etiopatogenia Da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah	105
Conclusões.....	108
Referências Bibliográficas	110
Anexos.....	118
Anexo A - Produção do Conjugado de Anti-IgG de Búfalo	119
Anexo B - Técnicas de Processamento para Avaliação das Amostras Teciduais.....	124
Anexo C - Especificações Técnicas dos Anticorpos Utilizados.....	132
Resumo.....	137
Abstract	138

Lista de Figuras

Figura 1- Características gerais das caderinas clássicas e suas relações com as proteínas intracitoplasmáticas.....	19
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura geral dos complexos desmossomos-tonofilamentos e seus componentes.	20
Figura 3 - Diagrama ultra-estrutural do desmossomo, com seus componentes e domínios (NORTH et al, 1999).	21
Figura 4 - Distribuição das isoformas de desmocollinas no epitélio da pele e das mucosas em bovinos e humanos (NORTH et al, 1996; COZZANI et al, 2000).	25
Figura 5 - Distribuição das isoformas de desmogleínas no epitélio da pele e das mucosas (NORTH et al, 1996; KOCH et al, 1997; ANHALT, 1999; COZZANI et al, 2000).	28
Figura 6 - Modelo da estrutura molecular do desmossomo. Na placa se relacionam os filamentos intermediários e a desmoplaquina e esta com as demais proteínas de ligação: placoglobina e placofilina. O domínio intracelular das caderinas interage com a placoglobina. Entre os dois queratinócitos encontram-se os domínios extracelulares das caderinas desmossômicas, que constituem a desmoglea. Dsc: desmocollina; Dsg: desmogleína.....	31
Figura 7 - Representação da localização dos principais antígenos do pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar na epiderme.....	41
Figura 8 - Esquema representando a placa desmossômica de um indivíduo normal (porção superior do desenho) e de um portador da Síndrome da Fragilidade da Pele/Displasia Ectodérmica (porção inferior do desenho), onde nota-se total desorganização da placa e perda da estabilidade entre as proteínas, a qual que determina a perda da coesão entre caderinas e o desprendimento das células. PKP-1: placofilina-1.	47
Figura 9 - Heredograma dos animais portadores da Genodermatose Mecanobolhosa nascidos na EMBRAPA-CPACT.	48
Figura 10 - Heredograma dos animais incluídos no rebanho experimental consanguíneo. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho incluído no rebanho experimental e círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental.	51
Figura 11 - Heredograma do primeiro animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 655. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental; quadrado azul preenchido: macho com a Genodermatose. Os nomes grifados em azul indicam touros heterozigotos para o gene que determinou a doença.	53
Figura 12 - Heredograma do segundo animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 678. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental e círculo rosa preenchido: fêmea com a Genodermatose. Os nomes grifados em azul indicam touros clinicamente sadios, mas portadores do gene que determina a doença.....	54

Figura 13 - Heredograma do terceiro animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 706. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental e círculo rosa preenchido: fêmea com a Genodermatose. Os nomes grifados em azul indicam touros heterozigotos para o gene que determinou a doença	55
Figura 14 - Heredograma do quarto animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 723. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental e quadrado azul preenchido: macho com a Genodermatose e quadrado marrom: macho com outra doença hereditária. Os nomes grifados em azul indicam touros heterozigotos para o gene que determinou a doença.....	56
Figura 15 - Cálculo realizado para determinar a quantidade de IgG/ml obtida após a cromatografia.	60
Figura 16 - Cálculo realizado para determinar a quantidade de IgG/ml obtida após a cromatografia.	60
Figura 17 - Determinação do volume correspondente a 1mg de IgG.	60
Figura 18 - Cálculo realizado para determinar a quantidade de IgG/ml obtida após a precipitação com sulfato de amônio.....	61
Figura 19 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (19A) Lesões no pescoço induzidas pelo atrito da corda no momento de laçar o animal. Demais lesões nas orelhas e face também foram induzidas por traumatismos ocasionais. Notam-se ainda lesões cicatrizadas na face e deformidades do estojo córneo do chifre. (19B) Detalhe da lesão induzida por traumatismo trivial moderado. (19C) Observa-se a deformidade do estojo córneo dos cascos, além da perda de um dos casquinhos no momento em que se manejava o búfalo.	67
Figura 20 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (20A) Pele submetida à fricção leve. Observa-se a lesão típica da doença, caracterizada pelo desprendimento suprabasal da epiderme. Algumas células acantolíticas também podem ser observadas no interior da fenda. (20B) Pele íntegra de um búfalo doente. Não há qualquer sinal de lesão.	68
Figura 21 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (21A) Lesão cicatrizada. (21B) Aspecto histológico de uma lesão cicatrizada. (21C) Aspecto histológico de uma área submetida a várias lesões subseqüentes.	70
Figura 22 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (22A) Búfalo 655, com 5 meses de idade juntamente com sua mãe (vaca 406) sadia. (22B) Búfalo 655 com 1 ano, 678 com 5 meses e 706 com 4 meses de idade. (22C) Búfalo 678 com 2 anos e 8 meses e 706 com 2 anos e 7 meses de idade.....	71
Figura 23 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. Búfalo 706. (23A) Gengiva e (23B) esôfago de animal doente, demonstrando que mesmo após fricção intensa não houve lesão do epitélio das mucosas. (23C) Aspecto histológico normal do epitélio da mucosa do esôfago desse mesmo animal.....	72
Figura 24 - Imunofluorescência direta para pesquisa de fração C1 do complemento na Genodermatose Mecanobolhosa. (24A) Marcação positiva em linfonodo mesentérico de búfalo (controle positivo). (24B) Pele de búfalo sadio (controle	

	negativo), (24C) pele íntegra e (24D) pele lesada de doente demonstrando que não há marcação para fração C1 do complemento.	74
Figura 25	- Pesquisa da deposição de auto-anticorpos na Genodermatose Mecanobolhosa. (25A) Linfonodo mesentérico de búfalo, exibindo marcação positiva para IgG de búfalo (controle positivo). (25B) Pele de búfalo normal (controle negativo). (25C) Pele íntegra de búfalo doente e (25D) pele de búfalo doente com lesão. Nas peles testadas com conjugado anti-IgG de búfalo observou-se somente marcação inespecífica.....	76
Figura 26	- Estudo da distribuição das desmoplaquinas I/II na Genodermatose Mecanobolhosa. (26A) Esôfago de bovino em corte de parafina (diluição de 1:5). (26B) Esôfago de búfalo sadio em corte de congelação (diluição de 1:10) (26C) Pele de búfalo sadio em corte de congelação (diluição de 1:20). Todas essas amostras apresentaram imunomarcação positiva.....	78
Figura 27	- Distribuição das desmoplaquinas I/II na Genodermatose dos Búfalos Murrah. (27A) Área perilesão de animal doente com marcação normal. (27B) Área de lesão, onde observa-se que não há marcação na face basal dos queratinócitos basais. (27C) Padrão de imunomarcação de anexos: queratinócitos da bainha do folículo piloso exibindo a marcação típica. (27D) Glândula sebácea apresentando marcação somente das células basalóides de reserva.	80
Figura 28	- Estudo da distribuição das desmoplaquinas I/II na Genodermatose Mecanobolhosa. (28A) Pele submetida à fricção leve. Tanto no assoalho como no teto da fenda há marcação típica. (28B) Detalhe do teto da fenda onde se observa marcação da membrana. (28C) Pele submetida à fricção moderada. Células acantolíticas perderam a marcação de membrana e apresentavam marcação difusa. (28D) Pele cicatrizada com marcação característica de membrana.	81
Figura 29	- Microscopia Eletrônica de Transmissão da pele dos búfalos controles. (29A) Hemidesmossomos (↓) a intervalos regulares na JDE. (29B e 29C) Hemidesmossomos constituídos pela placa eletrodensa (▼), lâmina lúcida (LC), lâmina densa (LD) e filamentos de ancoragem (↑). (29D) Numerosos desmossomos (↓) com morfologia variada. (29E) Detalhe de dois desmossomos onde se observam os tonofilamentos (I) aderidos às placas (P), a dupla membrana celular (◆) e a desmoglea (D).....	84
Figura 30	- Microscopia Eletrônica da pele de animais controle. (30A) Camada basal (B) aderida à derme (D). Nota-se o escasso espaço intercelular (*). (30B) Camada Espinhosa (E) com células bem coesas e espaços intercelulares estreitos (*). (30C) Última célula da camada granulosa com grânulos de querato-hialina (G) e primeiras células da camada córnea (C). (30D) Detalhe da camada córnea formada por células com membranas espessas e cujas organelas desapareceram.....	86
Figura 31	- Microscopia Eletrônica de Transmissão da pele de portadores da Genodermatose de Búfalos Murrah (31A) Células basais (B) firmemente aderidas à derme (D). (31B) A junção dermo-epidérmica (JDE) está preservada. (31C) Todas as estruturas dos hemidesmossomos estão íntegras (↓).....	89

Figura 32 - Microscopia Eletrônica de Transmissão na Genodermatose Mecanobolhosa. (32A) Estrato espinhoso com células coesas e desmossomos íntegros (↓). (32B) Desmossomos íntegros: tonofilamentos (T), placa (P), membrana celular (↓) e desmoglea (D). (32C) Queratinócitos da primeira camada espinhosa (E) formando o teto de uma fenda. (32D) Metades de desmossomos (▲) observadas em células que se desprenderam.....	90
Figura 33 - Microscopia Eletrônica na Genodermatose de búfalos Murrah. (33A) Área perilesão. Aumento dos espaços (*) entre as células basais. (33B) Microvilos (∇) nas membranas celulares. (33C) Perda de coesão na superfície lateral dos queratinócitos (*). (33D) Queratinócitos basais (B) formam o assoalho da fenda (F).....	91
Figura 34 - Microscopia Eletrônica na Genodermatose Mecanobolhosa. (34A) Pele íntegra demonstrando ligeiro aumento dos espaços intercelulares (*). (34B) Pele perilesão e teto da fenda apresentaram células frouxas. (34C) Células espinhosas (E) que se desprenderam totalmente das basais contituíram o teto da fenda (F). As faces laterais destas células permaneceram parcialmente coesas. (34D) Microvilos (∇) e desmossomos íntegros (↓) nas faces laterais de queratinócitos espinhosos (E).....	93
Figura 35 - Microscopia Eletrônica de Transmissão na Genodermatose dos Búfalos Murrah. (35A) Células acantolíticas (A) no interior da fenda. Elas assumem aspecto arredondado ou (35B) alongado. (35C e 35D) Nota-se a presença de metades de desmossomos (▲) ou ausência desses nas células acantolíticas.....	95

Lista de Quadros

Quadro 1 - Papel de estruturas das junções célula-matriz e célula -célula em algumas doenças vésico-bolhosas hereditárias e adquiridas (BURGESON & CHRISTIANO, 1997; COZZANI et al, 2000; HERTL, 2000).	34
Quadro 2 - Formas de pênfigo e antígenos associados (ANHALT, 1999; COZZANI et al, 2000).	38
Quadro 3 - Animais sadios e doentes obtidos no rebanho experimental em cada período reprodutivo enquanto o rebanho experimental consangüíneo foi mantido.	52
Quadro 4 - Detalhes sobre os búfalos utilizados nesse experimento.	52
Quadro 5 - Amostras colhidas por animal e utilizadas para o estudo da patogenia da Genodermatose dos Búfalos Murrah	58
Quadro 6 - Volume de sangue e soro correspondente, obtidos de cada um dos coelhos sacrificados.	61
Quadro 7 - Produtos obtidos da purificação do soro do coelho 3 por cromatografia em coluna de proteína A.	61
Quadro 8 - Percentagem de reatividade cruzada de mAbs para imunoglobulinas bovinas em diferentes espécies.	100

Lista de Abreviaturas

BPAg1 e 2: antígeno do penfigóide bolhoso 1 e 2

CK: citoqueratina

DPI-II: desmoplaquina I e II

DP(s): desmoplaquina(s)

Dsc(s): desmocolina(s)

Dsg(s): desmogleína(s)

EB(s): Epidermólise(s) Bolhosa(s)

IF: imunofluorescência

IFD: imunofluorescência direta

ITCFO: Isotiocianato de Fluoresceína

JDE: junção dermo-epidérmica

mAb(s): anticorpo(s) monoclonal(is)

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

PE: Pênfigo Eritematoso

PF: Pênfigo Foliáceo

PKP-1: placofilina-1

PNP: Pênfigo Paraneoplásico

PV: Pênfigo Vulgar

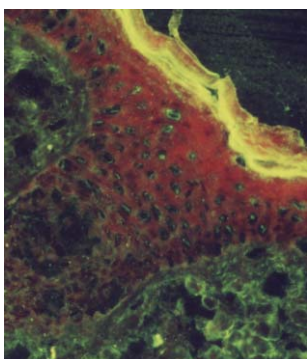
PVeg: Pênfigo Vegetante

PPP: Pênfigo Pustular Pan-epidérmico

QPH(s): Queratoderma(s) Palmoplantar(es) Hereditário(s)

RD: Registro Definitivo

Introdução



INTRODUÇÃO

A pele é um órgão importante cujas funções, além de relacionadas com a aparência, estão compulsoriamente ligadas à sobrevivência (ELDER et al, 1997). Vários mecanismos e especializações dos queratinócitos mantêm a integridade da pele. Dentre esses destacam-se os complexos juncionais, célula-matriz (BORRADORI & SONNENBERG, 1996) e célula-célula (NORTH et al, 1999), que atuam na manutenção da estabilidade e integridade da pele. Além disso, funcionam como barreiras seletivas para moléculas e são importantes no processo de diferenciação da epiderme (FUCHS et al, 1997; NORTH et al, 1999).

Alterações bioquímicas ou estruturais, primárias ou secundárias nos complexos juncionais podem determinar o aparecimento de lesões que compõem o extenso grupo das dermatoses vésico-bolhosas. As doenças vesiculares e bolhosas da pele acometem humanos (FINE et al, 1993) e animais domésticos (GROSS et al, 1992). Seu diagnóstico preciso por vezes é difícil, pois algumas delas compartilham muitas características clínicas e morfológicas (OLIVRY et al, 1999b).

As doenças vésico-bolhosas podem resultar de processos auto-imunes, nos quais há produção e deposição de auto-anticorpos que agredem a Junção Dermo-epidérmica (JDE), as células basais ou estruturas intracelulares das junções da epiderme. Defeitos genéticos que acarretam perda da integridade estrutural dos complexos juncionais também determinam a formação de fendas, vesículas e bolhas dérmicas e epidérmicas (GROSS et al, 1992).

Dermatoses bolhosas auto-imunes compreendem um grupo de doenças severas caracterizadas pela formação de auto-anticorpos que interferem na estabilidade dos queratinócitos. As respostas humorais ou celulares podem ser direcionadas contra moléculas de superfície dos queratinócitos e determinam acantólise, como ocorre nos Pênfigos. Vesículas subepidérmicas ocorrem quando o alvo da doença auto-imune é a junção dermo-epidérmica, como no Penfigóide Bolhoso e na Epidermólise Bolhosa Adquirida (SUTER et al, 1998; OLIVRY et al, 2000). Outras dermatoses auto-imunes têm como alvo estruturas dos folículos pilosos (SUTER et al, 1998).

Várias doenças hereditárias se devem a alterações nos complexos juncionais responsáveis pela coesão de queratinócitos da epiderme e mucosas. As Epidermólises Bolhosas ocorrem devido a mutações em proteínas que constituem a junção dermo-epidérmica (BURGESON & CHRISTIANO, 1997). As doenças de Darier e Hailey-Hailey (GÖTTLIEB & LUTZNER, 1970; SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992) decorrem de mutações em genes de bombas de cálcio, o que leva a perda da estabilidade dos desmossomos e acantólise suprabasal (MISSIAEN et al, 2000; SUDBRAK et al, 2000). Na Síndrome de Displasia Ectodérmica e Fragilidade Epidérmica, um defeito na placofilina-1 da placa desmossômica, determina desprendimento da pele e alterações nos pêlos e unhas (McGRATH, 1999; WHITTOCK et al, 2000).

Dentro desse contexto procurou-se estudar uma dermatose vésico-bolhosa, de caráter caráter autossômico recessivo que acomete búfalos Murrah. A doença se caracteriza pela extrema fragilidade da epiderme e dos estojos córneos. Histologicamente há formação de fenda suprabasal e acantólise moderada na epiderme. Esses achados foram confirmados pela microscopia eletrônica de transmissão (RIET-CORREA et al, 1994; FERNANDES et al, 1996).

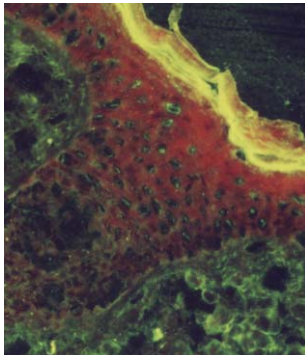
Os estudos realizados até então não permitiram a compreensão da patogenia dessa doença. Sabe-se, no entanto, que doenças hereditárias transmitidas por genes

recessivos são de difícil diagnóstico e controle, como é o caso desta dermatose bolhosa dos búfalos, e que revertem em importantes perdas econômicas e depreciação da espécie e/ou raça dos animais envolvidos.

O entendimento da patogenia da doença é fundamental para que avanços possam ocorrer no sentido da identificação dos indivíduos portadores dos genes que a determinam, contribuindo assim para que sua propagação possa ser controlada.

Este trabalho teve então por objetivo, contribuir com o estudo da patogenia dessa dermatose que acomete os búfalos. Em primeiro lugar foi necessário verificar o possível caráter auto-imune da doença. Além disso, foi necessário identificar as estruturas celulares comprometidas no processo e, finalmente, buscar indícios para a identificação da estruturas ou proteínas juncionais alteradas nessa doença.

Revisão



REVISÃO DE LITERATURA

Considerando os interesses específicos do trabalho, esse capítulo tem como tema principal os complexos de junção célula-célula da epiderme, e em especial, os desmossomos. São apresentadas a estrutura normal desses complexos e as principais doenças cutâneas nas quais eles estão envolvidos.

Complexos Juncionais

No epitélio escamoso, as faces livres de queratinócitos adjacentes são unidas através de dois tipos principais de junções celulares: junções adesivas e desmossomos (LEWIS et al, 1997). Apesar das diferenças estruturais e funcionais entre as junções, elas apresentam aspectos comuns na sua montagem (TROYANOVSKY, 1999).

Os receptores de adesão em ambas junções são caderinas. Elas se ligam ao citoesqueleto e atuam nas cascatas de sinalização intracelular, através de diversos complexos multiprotéicos. As caderinas são subdivididas em caderinas clássicas que medeiam a adesão célula-célula nas junções adesivas, e em caderinas desmossômicas (TROYANOVSKY, 1999).

As caderinas são glicoproteínas unipasso compostas de 700-750 aminoácidos (ALBERTS et al, 1994). Sua região extracelular possui cinco ectodomínios (EC1-5) (TROYANOVSKY, 1999) dos quais quatro são homólogos (EC1-4) e possuem sítios de ligação para o cálcio (ALBERTS et al, 1994; NICOLAS & STAQUET, 1995). Depleção dos íons de cálcio, que coordenam os domínios EC sucessivos, resulta no colapso da estrutura alongada da caderina (TROYANOVSKY, 1999), que será rapidamente degradada por enzimas proteolíticas (NICOLAS & STAQUET, 1995). A porção extracelular das caderinas medeia a adesão célula-célula através de ligações homofílicas (ALBERTS et al, 1994; NICOLAS & STAQUET, 1995). A porção citoplasmática das caderinas clássicas relaciona-se com filamentos de actina, enquanto que a das caderinas desmossômicas relaciona-se com filamentos de queratina (LEWIS et al, 1997). Nos dois tipos de caderinas essas interações são mediadas por proteínas de ligação (ALBERTS et al, 1994).

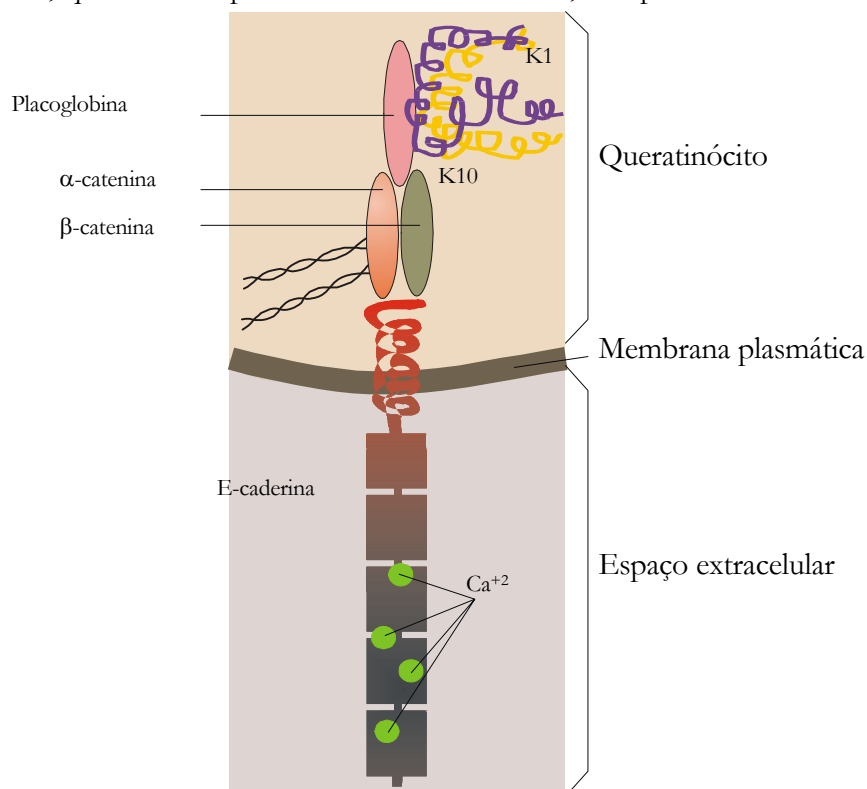
Várias proteínas citoplasmáticas compõem as junções adesivas e os desmossomos. A placoglobina, que pertence à família de genes *Armadillo*, é o principal componente estrutural dos desmossomos e das junções adesivas (WITCHER et al, 1996) e é a única proteína citoplasmática comum aos dois tipos de junções (LEWIS et al, 1997).

Junções Adesivas

Junções adesivas são complexos de adesão compostos por caderinas clássicas (E-caderina ou P-caderina, no epitélio escamoso), ligadas à β -catenina ou à placoglobina, que por sua vez interagem com a α -catenina. Essa última se liga aos filamentos de actina do citoesqueleto (Figura 1) (LEWIS et al, 1997).

Figura 1- Características gerais das caderinas clássicas e suas relações com as proteínas intracitoplasmáticas.

A β -catenina, que também pertence à família *Armadillo*, compartilha cerca de 65% da



sua sequência de aminoácidos com a placoglobina. Apesar disso, ela não possui a dupla habilidade de interação da placoglobina. Ela se associa somente com as caderinas clássicas (LEWIS et al, 1997).

A formação de junções adesivas parece ser um pré-requisito para formação dos desmossomos (LEWIS et al, 1997)

Complexos Desmossomos-tonofilamentos

Desmossomos

Os desmossomos são complexos juncionais responsáveis pela firme adesão célula-célula dos queratinócitos (Figura 2) (ELDER et al, 1997). São junções intercelulares altamente especializadas que agregam os filamentos intermediários à superfície celular nos pontos de adesão célula-célula (KOWALCZYK et al, 1997). Podem ser facilmente detectáveis à microscopia óptica quando há edema intercelular (espongiose) (ELDER et al, 1997). Os desmossomos são mais abundantes nos epitélios estratificados, embora ocorram em outros epitélios, como o de transição, pseudoestratificado e epitélio simples. Também foram detectados em algumas células aracnoidais e no interior dos discos intercalados do miocárdio (COWIN et al, 1985).

Basicamente, os desmossomos são organelas compartilhadas por células adjacentes (LIN et al, 1997). Na face citoplasmática da membrana celular de cada um dos queratinócitos adjacentes existem estruturas protéicas denominadas de placas, que servem como sítios de ancoragem para os filamentos intermediários (COWIN et al, 1985; LIN et al, 1997). O compartimento celular estreito, que separa uma face externa do queratinócito da outra, constitui o centro ou desmoglea e é contíguo com o espaço intercelular da epiderme (LIN et al, 1997). Nesse ponto os desmossomos medeiam adesão firme entre as células (COWIN et al, 1985).

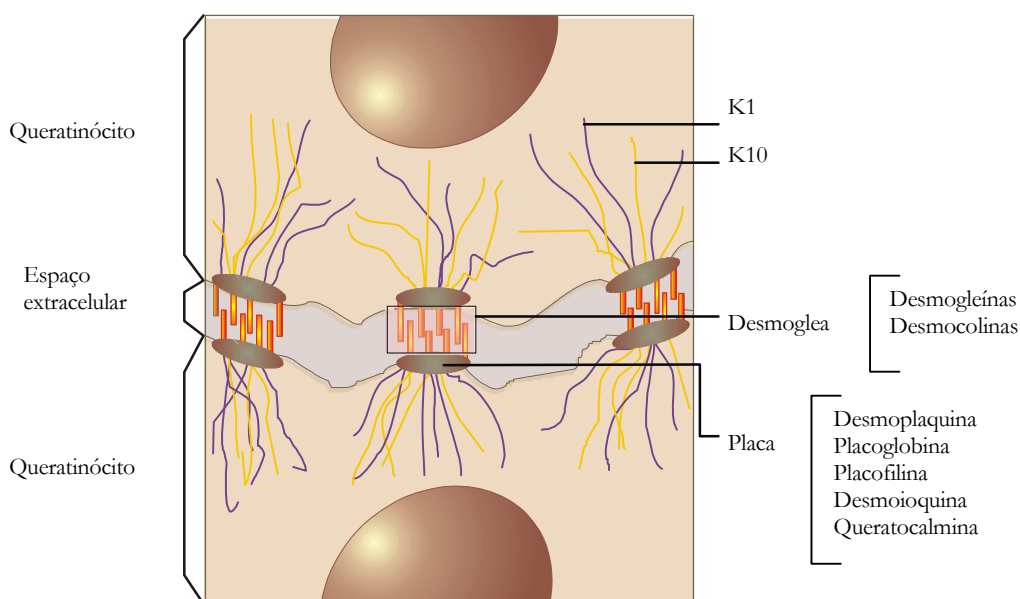


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura geral dos complexos desmossomos-tonofilamentos e seus componentes.

Ultra-estruturalmente (Figura 3) os desmossomos são encontrados nos pontos em que as membranas de queratinócitos adjacentes se interdigitam. Possuem cerca de 0,1-0,5 μ m de diâmetro e são maiores nas camadas suprabasais do que na basal (NORTH et al, 1996). Eles contêm duas regiões eletrodensas, que compreendem as membranas plasmáticas das células adjacentes e as placas citoplasmáticas que ancoram os filamentos intermediários (KOWALCZYK et al, 1997). As placas de fixação eletrodensas têm 10-15nm de espessura em cada desmossomo (ELDER et al, 1997) e podem ser subdivididas em placa densa externa, subjacente à membrana plasmática, e placa densa interna, na qual provavelmente os filamentos intermediários se inserem (KOWALCZYK et al, 1997). A membrana plasmática de cada queratinócito encontra-se próximo da placa de fixação do desmossomo. Cada membrana plasmática é constituída por duas linhas eletrodensas, denominadas de folhetos interno e externo, e separadas por uma linha eletrolucente (CROSS & MERCER, 1993).

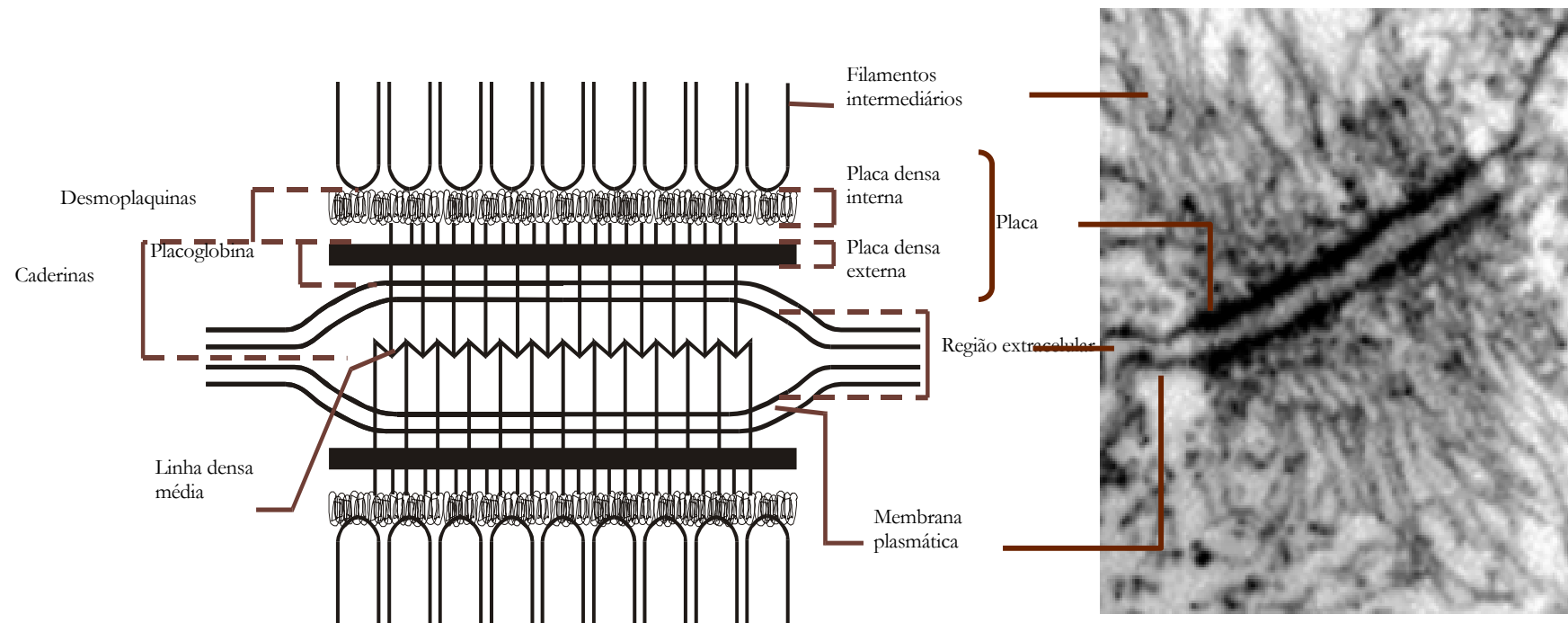


Figura 3 - Diagrama ultra-estrutural do desmossomo, com seus componentes e domínios (NORTH et al, 1999).

No centro do desmossomo reside a desmoglea ou cimento intercelular, que é mais eletrodenso nas proximidades do folheto externo da membrana celular. Seu centro é eletrofluente fazendo exceção uma linha eletrodensa central e delgada, denominada de camada de contato intercelular (ELDER et al, 1997) (Figura 3). A substância do cimento intercelular é evidenciada quando os cortes são tratados com vermelho de rutênio e lantânio. Qualquer uma dessas substâncias promove maior densidade eletrônica ao longo da superfície celular (HASHIMOTO & LEVER, 1970).

Durante o processo de cornificação, alterações ultra-estruturais drásticas ocorrem no desmossomo, incluindo o desaparecimento das placas citoplasmáticas e o aumento da densidade da desmoglea. Esses desmossomos modificados perdem seu papel coesivo (MILS et al, 1992; CROSS & MERCER, 1993).

A estrutura molecular dos desmossomos vem sendo desvendada (NORTH et al, 1999; COZZANI et al, 2000). Eletroforese em gel de preparações da epiderme do focinho de bovinos revelou pelo menos oito bandas principais. Dentre elas, pelo menos seis proteínas individuais são constituintes verdadeiros dos desmossomos (COWIN et al, 1985). Os componentes dos desmossomos têm sido distribuídos em dois grupos, que compõem domínios extra e intracelulares distintos (LIN et al, 1997). Alguns desses componentes podem ser identificados por imuno-histoquímica (ELDER et al, 1997).

O primeiro grupo de componentes dos desmossomos é constituído por glicoproteínas glicosiladas transmembrana pertencentes à superfamília das caderinas (LIN et al, 1997). As caderinas desmossômicas exibem um domínio extracelular (MILS et al, 1992; LIN et al, 1997) que compõe o centro do desmossomo, e um domínio intracelular que se insere na placa (FUCHS et al, 1997).

As caderinas desmossômicas são a desmocolina (Dsc) e a desmogleína (Dsg) (LIN et al, 1997). Cada uma delas possui pelo menos três isoformas, que constituem diferentes subfamílias de caderinas. As isoformas são expressas num padrão específico de acordo com o tecido e estágio de desenvolvimento. O padrão de expressão diferenciado na própria epiderme sugere que elas desempenhem um papel importante na diferenciação do epitélio (NORTH et al, 1996).

Os desmossomos são as únicas junções intercelulares que invariavelmente contêm os dois tipos de caderinas transmembrana, porém ainda não se conhece ao certo o padrão de interações entre elas. Evidências indicam que ao contrário das caderinas clássicas que são homodiméricas as caderinas desmossômicas podem realizar ligações tanto homo como heterotípicas envolvendo interações Dsc-Dsc, Dsg-Dsg ou Dsc-Dsg. (MARCOZZI et al, 1998). As caderinas desmossômicas necessitam de proteínas de ligação citoplasmáticas para interagir com os filamentos intermediários (SMITH & FUCHS, 1998).

As Dscs se diferenciam das caderinas clássicas em toda sua seqüência e possuem sítios diferentes de reconhecimento da adesão celular (Phe/ TyrAlaThr/Ser ao invés de HisAlaVal, respectivamente). São reconhecidos três genes para desmocolinas: DSC1, DSC2 E DSC3. Através de *splicing*, cada um deles pode dar origem a dois produtos designados por "a" e "b" (MARCOZZI et al, 1998). Acredita-se que, enquanto as formas "a" da Dsc se sobrepõem a moléculas da placa, como a placoglobina e desmoplaquina, as formas "b", mais curtas podem estar espacialmente separadas delas (NORTH et al, 1999).

A distribuição das Dsc 1, 2 e 3 tem sido estudada em tecidos de bovinos (NORTH et al, 1996) e humanos (COZZANI et al, 2000) (Figura 4). Nos bovinos a Dsc1 é

expressa nas células em diferenciação terminal na epiderme e no epitélio da língua. A Dsc2 está presente em todas as células que possuem desmossomos. A Dsc3 é expressa com maior intensidade nas células do estrato basal dos epitélios estratificados. Ao contrário de outras proteínas, sua expressão diminui gradualmente (NORTH et al, 1996).

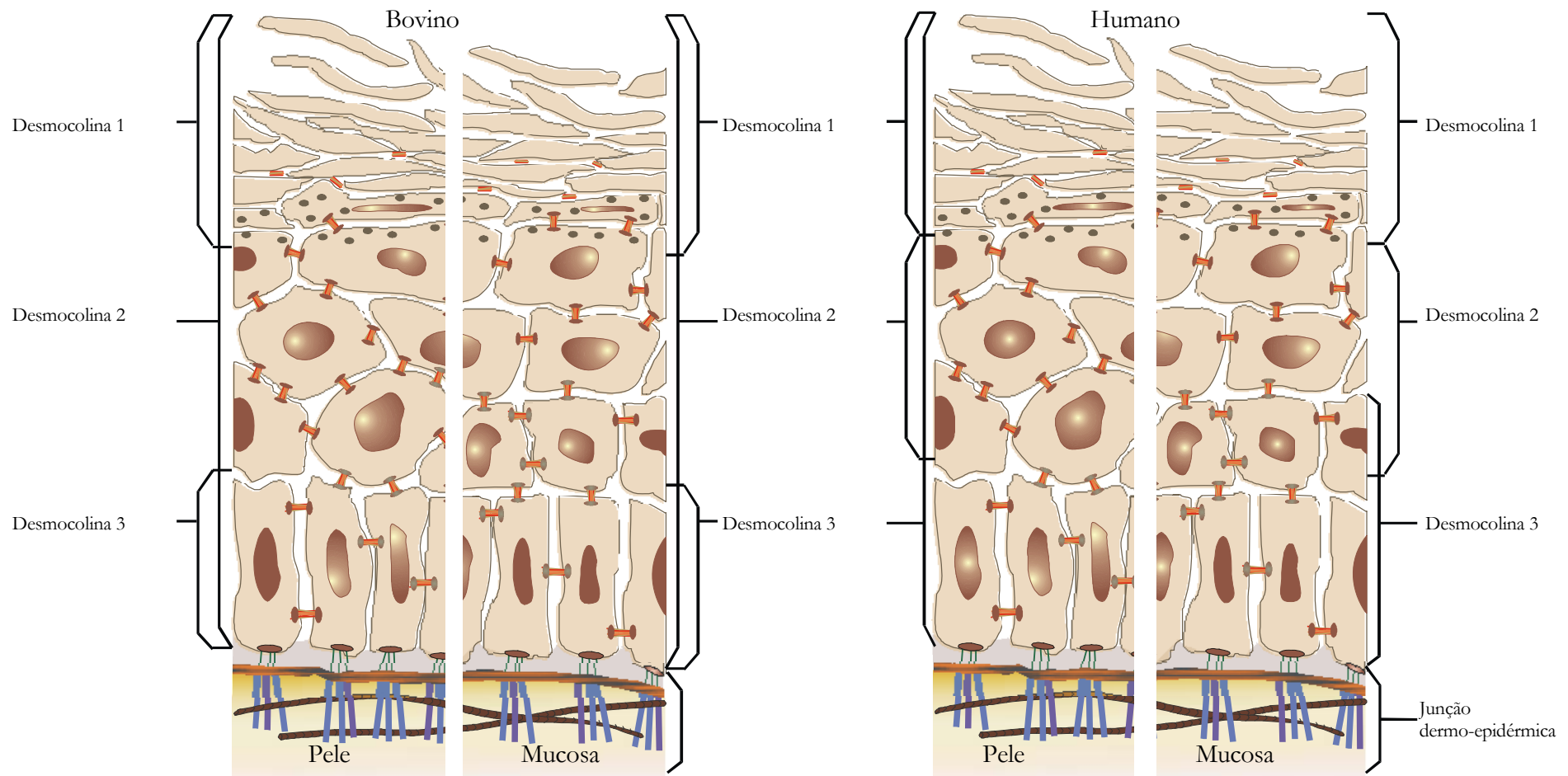


Figura 4 - Distribuição das isoformas de desmocolinas no epitélio da pele e das mucosas em bovinos e humanos (NORTH et al, 1996;

COZZANI et al, 2000).

Na epiderme dos humanos, a expressão da Dsc1 também é maior nas camadas mais superficiais. Já a Dsc2 parece ser mais evidente nas camadas profundas enquanto a Dsc3 é expressa amplamente em toda epiderme, e em outros epitélios estratificados. Nas mucosas, ela está limitada à camada basal e suprabasal profunda (COZZANI et al, 2000).

Estudos demonstram ainda, que um único desmossomo pode possuir mais de uma isoforma de desmocolina e que elas se misturam dentro dele, não ficando restritas a domínios distintos (NORTH et al, 1996).

São conhecidos três tipos de desmogleínas, sendo elas a Dsg 1, 2 e 3. Cada uma delas é codificada por genes diferentes, sendo eles respectivamente o DSG1, o DSG 2 e o DSG 3 (NORTH et al, 1999).

As desmogleínas possuem um único domínio citoplasmático, com 29 repetições de aminoácidos. Esse domínio se estende além da região homóloga da caderina onde há o sítio de reconhecimento da adesão celular (Arg/TyrAlaLeu) (MARCOZZI et al, 1998). Especialmente a Dsg3 estende-se através de toda a placa externa, se prolongando além das Dscs (NORTH et al, 1999).

Assim como as desmocolinas, as isoformas de desmogleínas também se distribuem de forma diferenciada nos estratos da epiderme (Figura 5) (NORTH et al, 1996).

A Dsg1 é expressa em todas as camadas suprabasais (KOCH et al, 1997). A Dsg2 é expressa exclusivamente na camada basal (COZZANI et al, 2000). A Dsg3 predomina na camada basal e pode ocorrer nas primeiras células suprabasais (KOCH et al, 1997; COZZANI et al, 2000). Na mucosa oral a Dsg3 é expressa em todas as camadas do epitélio (ANHALT, 1999; COZZANI et al, 2000).

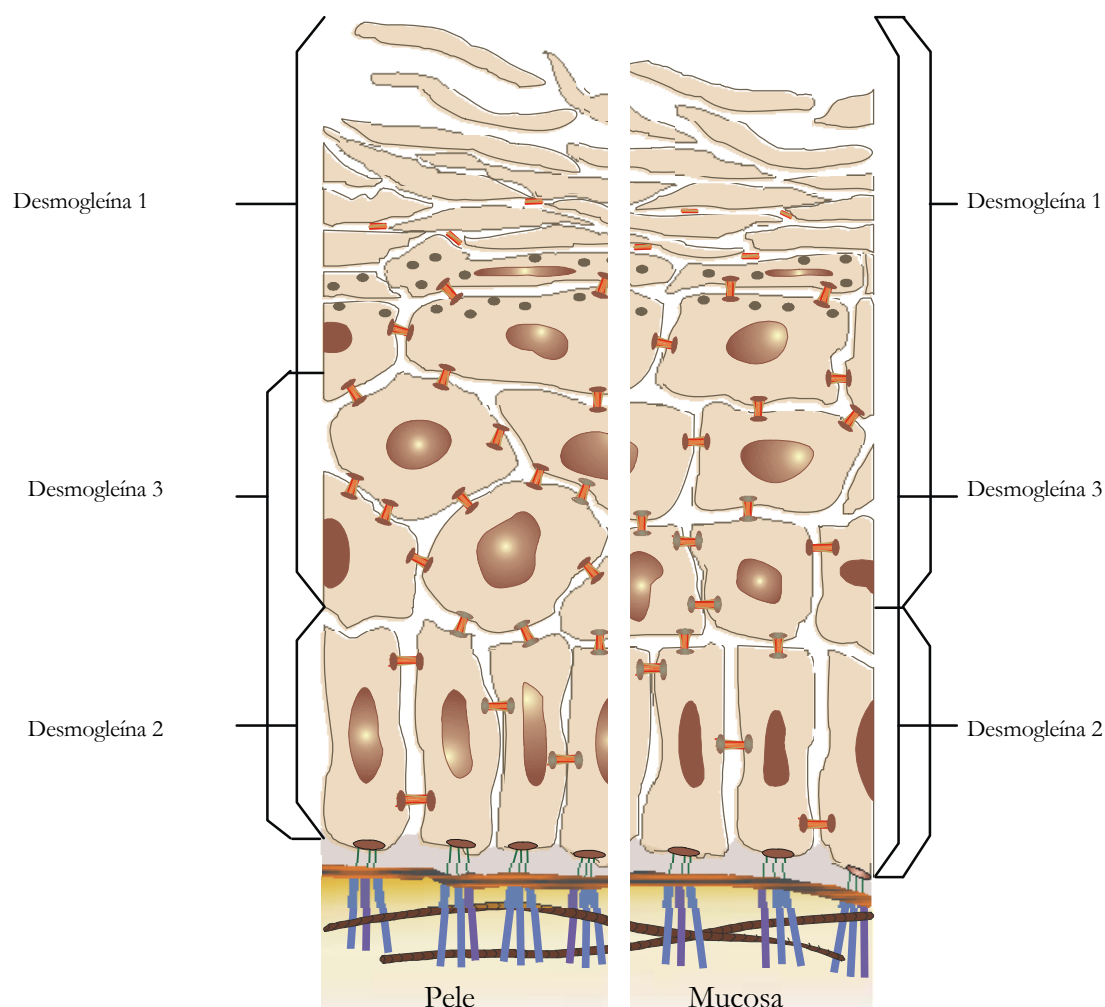


Figura 5 - Distribuição das isoformas de desmogleínas no epitélio da pele e das mucosas (NORTH et al, 1996; KOCH et al, 1997; ANHALT, 1999; COZZANI et al, 2000).

No segundo grupo de componentes dos desmossomos estão polipeptídios não glicosilados (ELDER et al, 1997; LIN et al, 1997) de alto peso molecular, que constituem a placa do desmossomo (MILS et al, 1992; LIN et al, 1997). Eles funcionam como proteínas de ligação entre as caderinas desmossômicas e os filamentos intermediários aos quais estão associados (ALBERTS et al, 1994; MARCOZZI et al, 1998; SMITH & FUCHS, 1998). Dentre eles estão as plaquinhas (desmoplaquinhas I e II, plectina, envoplaquina e periplaquina) e as proteínas *Armadillo* (placoglobina e placofilinas) (MILS et al, 1992; LIN et al, 1997; COZZANI et al, 2000). Outros componentes como a queratocalmina (α -calmodulina ou desmocalmina) e a desmoioquina também são citados (LIN et al, 1997).

As plaquinhas, de um modo geral, estão envolvidas na ancoragem dos filamentos intermediários de queratina à membrana plasmática e ao envelope cornificado do queratinócito (COZZANI et al, 2000).

As desmoplaquinas (DPs) pertencem a uma pequena família de moléculas de ligação do citoesqueleto. Elas contêm um domínio alongado em α -hélice, que possui cerca de 130 homodímeros enovelados, delimitado por domínios globulares que formam uma cabeça (1014 aminoácidos) e uma cauda (924 aminoácidos) (SMITH & FUCHS, 1998). A porção amino-terminal das DPs se situa dentro da placa densa externa e a porção carboxi-terminal fica cerca de 40nm de distância, na zona de inserção dos filamentos intermediários. Isto é consistente com a proposta de arranjo paralelo das DPs em dímeros ou agregados ainda maiores (NORTH et al, 1999).

As DP I e II são codificadas pelo mesmo gene. A DP I possui o domínio alongado, é maior que a DP II (SMITH & FUCHS, 1998) e pode ser enovelada ou pregueada (NORTH et al, 1999).

A função mais evidente das DPs é ancorar a rede de filamentos intermediários do desmossomo. Na realidade, é provável que elas desempenhem um papel multifuncional no agrupamento e estabilização do desmossomo (GALLICANO et al, 1998).

A plectina se localiza mais profundamente que as DPs na placa do desmossomo. Ela se associa a vários tipos de filamentos do citoesqueleto e colabora com as DPs para agregar os filamentos intermediários ao desmossomo. A envoplaquina e a periplaquina ancoram os desmossomos e os filamentos intermediários ao envelope cornificado, possivelmente associadas com DPs (COZZANI et al, 2000).

As proteínas relacionadas à família *Armadillo* incluem a placoglobina e a placofilina (COZZANI et al, 2000).

A placoglobina tem cerca de 83kDa (COZZANI et al, 2000). Estudos demonstram que as repetições 1-4 estão envolvidas na ligação com a Dsg1 e que o sítio de ligação com a Dsc1a deve estar localizado nos domínios centrais da placoglobina (WITCHER et al, 1996). O complexo entre a placoglobina e a Dsg1 requer seis moléculas de placoglobina para cada Dsg, enquanto que uma única placoglobina interage com uma Dsc (COZZANI et al, 2000).

A placoglobina atua provavelmente potenciando: 1) a formação dos heterodímeros, 2) o acréscimo de dímeros nos sítios de contato célula-célula e 3) a estabilidade de caderinas desmossômicas (MARCOZZI et al, 1998). Além de ser um componente estrutural do desmossomo, a placoglobina parece desempenhar um papel de sinalização na sua organização (LEWIS et al, 1997).

A placofilina se situa provavelmente próximo da membrana plasmática (NORTH et al, 1999). Até agora foram identificadas três isoformas: placofilina-1, placofilina-2 e placofilina-3 (COZZANI et al, 2000). O componente do desmossomo anteriormente conhecido como Banda 6 corresponde à placofilina-1 (PKP-1) (KOWALCZYK et al, 1997). Ela ocorre em desmossomos de epitélios estratificados e complexos, enquanto a placofilina-2 ocorre nos desmossomos de epitélios simples (GALLICANO et al, 1998). Estudos *in vitro* demonstram que a PKP-1 pode se ligar diretamente às caderinas desmossômicas e atuar como ligante dos filamentos intermediários. É provável que a PKP-1 facilite a ligação dos filamentos intermediários à placa, por desencadear o recrutamento de desmoplaquina para o desmossomo. A PKP-1 se relaciona e recruta DPs para as bordas da célula através da sua cabeça e não através dos seus domínios repetitivos *Armadillo*. Dessa forma, a PKP-1 pode se associar lateralmente a múltiplas moléculas de DP, formando dímeros ou múltímeros de PKP-1-DP e aumentando a

possibilidade de interações do desmossomo com o citoesqueleto, o que tornaria a célula menos suscetível ao stress mecânico (KOWALCZYK et al, 1999).

As interações que permitem a agregação das caderinas desmossômicas com os filamentos intermediários do citoesqueleto ainda estão sendo caracterizadas (Figura 6).

A DP, placoglobina e placofilina residem na mesma zona dentro placa, que se localiza entre a membrana plasmática e os filamentos intermediários (SMITH & FUCHS, 1998), porém ainda não são conhecidas todas as possibilidades de interações entre essas moléculas e a hierarquia com que elas ocorrem (KOWALZYCK et al, 1997). As DPs interagem com a placoglobina, placofilina e plectina e tendem a se arranjar em dímeros ou agregados ainda maiores. Elas se ligariam diretamente às Dscs ou à placoglobina e placofilina através de seu domínio amino-terminal (COZZANI et al, 2000).

As DPs não se ligam às Dsgs (KOWALZYCK et al, 1997) e funcionam como sítio de ligação dos filamentos intermediários. Assim, a disponibilidade de complexos caderina-placoglobina é o limitante da quantidade total de desmoplaquina na junção e esta, conseqüentemente, do número de tonofilamentos que interagem com o desmossomo. Nesse contexto, a PKP-1 atuaria recrutando DPs para o desmossomo e com isso possibilitaria maior interação dos filamentos intermediários com a placa (KOWALCZYK et al, 1999).

É possível que outras proteínas desmossômicas, como a pinina possam, também, intermediar as interações entre placoglobina e caderinas desmossômicas (KOWALZYCK et al, 1997). Nas camadas onde existe o envelope cornificado as proteínas envoplaquina e periplaquina é que intermediam a ligação das desmoplaquinas com a queratina (NORTH et al, 1996; GALLICANO et al, 1998).

Deve-se levar em conta que os desmossomos, apesar de estruturas mecânicas resistentes, são dinâmicos e sujeitos a reposição e troca contínua dos seus componentes. Um desmossomo pode ser completamente desagregado e reconstruído pela inserção aleatória de diferentes isoformas de glicoproteínas (NORTH et al, 1996; GALLICANO et al, 1998).

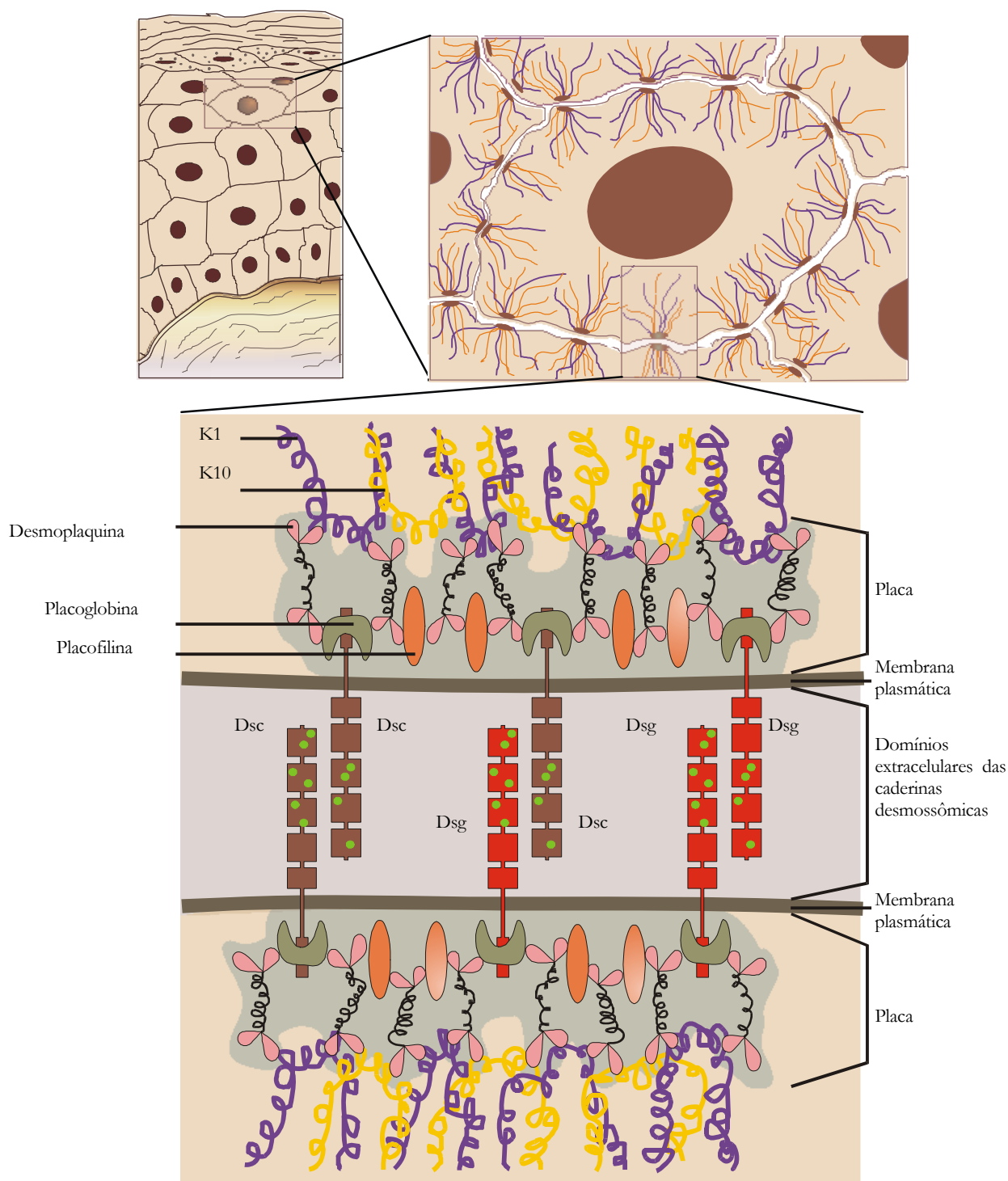


Figura 6 - Modelo da estrutura molecular do desmossomo. Na placa se relacionam os filamentos intermediários e a desmoplaquina e esta com as demais proteínas de ligação: placoglobina e placofilina. O domínio intracelular das caderinas interage com a placoglobina. Entre os dois queratinócitos encontram-se os domínios extracelulares das caderinas desmossômicas, que constituem a desmoglea. Dsc: desmocolina; Dsg: desmogleína.

Tonofilamentos

Os queratinócitos do estrato basal e do espinhoso sintetizam filamentos intermediários de queratina, denominados de tonofilamentos. Esses filamentos se associam ao desmossomo e auxiliam na manutenção da integridade da epiderme (CROSS & MERCER, 1993).

As queratinas ou citoqueratinas são proteínas fibrosas sem atividade enzimática conhecida. São caracterizadas principalmente pelo seu domínio central alongado em α -hélice. As citoqueratinas constituem duas classes de filamentos intermediários: CKI ácidas, de baixo peso molecular, e CKII básicas, de alto peso molecular. Apesar da similaridade entre os membros de ambas as classes, no agrupamento dos filamentos deve haver obrigatoriamente hetero-oligomeração em dímeros. Pelo menos *in vitro*, qualquer membro de uma classe pode se reunir com qualquer um da outra classe (HERRMANN & AEBI, 2000).

Nos humanos, as duas classes abrangem cerca de 20 citoqueratinas epiteliais e pelo menos 13 tricocíticas. As citoqueratinas epiteliais da classe I são representadas por queratinas ácidas (K9-20), enquanto que da classe II por queratinas básicas (CK1-8). O padrão de pareamento das citoqueratinas é específico nos tecidos e células (HERRMANN & AEBI, 2000). As células basais sintetizam as queratinas CK5 e CK14, enquanto que na primeira camada suprabasal as células trocam a síntese de CK5 e CK14 por CK1 e CK10 (NORTH et al, 1996)

Ultra-estruturalmente, os tonofilamentos são vistos como feixes eletrodensos, soltos e medem 7-8nm de diâmetro. Uma extremidade do tonofilamento está ligada à placa de fixação do desmossomo e a outra se encontra livre no citoplasma, próximo ao núcleo. Eles não atravessam as membranas de uma célula para a outra, como se pensava anteriormente (ELDER et al, 1997).

Dermatoses Vésico-bolhosas com Alterações nos Complexos Juncionais Célula-célula

Doenças vesiculares e bolhosas são caracterizadas pela formação de fendas, vesículas ou bolhas na pele (GROSS et al, 1992). Podem acometer também outros tecidos revestidos por epitélio, como mucosas e conjuntiva (FINE et al, 1993).

Em resumo, doenças que cursam com alterações nas células basais ou suprabasais da epiderme ou na JDE, estão incluídas entre as dermatoses vésico-bolhosas, independente da sua manifestação clínica (GROSS et al, 1992). A pele pode desenvolver vesículas e bolhas em função de numerosas causas e através de vários mecanismos. De um modo geral, essas doenças se devem a alterações nas estruturas que compõem os complexos juncionais célula-matriz ou célula-célula (Quadro 1) (BURGESON & CHRISTIANO, 1997).

As doenças vésico-bolhosas podem resultar de processos auto-imunes, nos quais há produção e deposição de auto-anticorpos que agridem a JDE, as células basais ou estruturas intracelulares das junções da epiderme. Defeitos genéticos que acarretam perda da integridade estrutural dos queratinócitos ou da JDE levam, também, à formação de fendas, vesículas e bolhas dérmicas e epidérmicas (GROSS et al, 1992).

O diagnóstico histológico das doenças vésico-bolhosas requer a avaliação de vários aspectos das lesões, como: 1) padrão do infiltrado inflamatório; 2) o tipo de alterações na epiderme e 3) o nível da separação ou da formação da fenda. Técnicas de imunofluorescência, microscopia eletrônica e imuno-histoquímica tem tornado o diagnóstico dessas doenças mais preciso (BLACK et al, 1983).

Quadro 1 - Papel de estruturas das junções célula-matriz e célula -célula em algumas doenças vesíco-bolhosas hereditárias e adquiridas (BURGESON & CHRISTIANO, 1997; COZZANI et al, 2000; HERTL, 2000).

Junção Alterada	Componente estrutural	Proteína envolvida	Doença genética	Doença auto-imune
célula-matriz	Filamentos intermediários	Queratina 5 e 14	EB simples	-
	Membrana Plasmática	Plectina BPAg1 (BP230)	EB-DM -	Doença Bolhosa Penfigóide Bolhoso Herpes Gestacional Pênfigo Parancoplásico Penfigóide Bolhoso Penfigóide Cicatricial Pênfigo Gestacional DBAL
Filamento de ancoragem		BPAg2 (BP180)	EBGAB	-
		Integrina $\beta 4$	EBJ-AP	-
		Integrina $\alpha 6$	EBJ-AP	-
		Periplaquina	-	Pênfigo Parancoplásico
		Proteína 97kDa	-	DBAL
		Laminina 5	-	Penfigóide Cicatricial
		Laminina ($\alpha 3$)	EBJ H	Penfigóide Cicatricial
		Laminina ($\beta 3$)	EBJ H	-
		Laminina ($\gamma 2$)	EBJ NL EBJ H EBJ NL	-
		Fibrilas de ancoragem	Colágeno Tipo VII Colágeno	EBDR HS EBDR M EBDD
...continuação				

célula-célula	Caderina	Dsg1	Pênfigo Vulgar (generalizado) Pênfigo Foliáceo Pênfigo Herpetiforme Pênfigo Paraneoplásico
		Dsg3	Pênfigo Vulgar (mucosas) Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo variante IgA Pênfigo induzido por droga
		Dsc 1	Pênfigo Vulgar Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo IgA
		Dsc2	Pênfigo Vulgar Pênfigo Foliáceo
	Proteínas da Placa	DPI DPII Plectina Envoplaquina Periplaquina Placofilina-1	Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo Paraneoplásico Pênfigo Paraneoplásico
	Filamento Intermediário	Queratinas	Displasia ectodérmica/FP QPH

Abreviaturas: EB: Epidermólise Bolhosa; EB-DM: EB com Distrofia Muscular; EBGAB: EB Generalizada Atrófica Benigna; EBJ: EB Juncional; EBJ-AP: EB Juncional com Atresia Pilórica; EBJ H: EBJ Herlitz; EBJ NL: EBJ Não Letal; EBD: EB Distrófica; EBDR HS: EBD Recessiva Halo-peu-Siemens; EBDR M: EBD recessiva Moderada; EBDD: EBD Dominante; DBAL: Dermatose bolhosa IgA linear; LES: lúpus eritematoso sistêmico; QPH: queratoderma plamoplantar hereditário; Dsg1: Desmogleína 1; Dsg3: Desmogleína 3; Dsc: Desmocolina; DPI e II: Demoplaquina I e II.

Complexo Pênfigo

O Pênfigo é uma dermatose bolhosa auto-imune severa, caracterizada pela formação de auto-anticorpos contra membrana plasmática dos queratinócitos. Determina a perda de adesão dos queratinócitos (acantólise) e a formação de bolhas ou pústulas (SUTER et al, 1998).

Aspectos Clínico-Patológicos das Formas de Pênfigo

Em veterinária, seis formas de Pênfigo são descritas em animais domésticos: Pênfigo Foliáceo, Pênfigo Eritematoso, Pênfigo Vulgar, Pênfigo Vegetante, Pênfigo Paraneoplásico e Pênfigo Pan-Epidérmico Pustular. Controvérsias existem quanto a real ocorrência de algumas dessas formas (SUTER et al, 1998).

Pênfigo Foliáceo

O Pênfigo Foliáceo (PF), ao contrário do que ocorre em humanos, é a dermatose bolhosa auto-imune mais comum dos animais domésticos (CARLOTTI, 1989), tendo sido relatada em cães, gatos, cabras (SUTER et al, 1998) e cavalos (SCOTT, 1989).

A doença também foi diagnosticada numa vaca Holstein-vermelha prenhe. As lesões regrediram após o nascimento do terneiro, indicando uma relação com a prenhez, à semelhança do que ocorre com algumas formas de pênfigo em humanos (SUTER et al, 1998).

Parece haver maior incidência em cães das raças Pastor Alemão (CARLOTTI, 1989), Dobermann, Dobermann Pinscher (CARLOTTI, 1989; GROSS et al, 1992), Collie barbado, Akita, Chow Chow, Newfoundland e Schipperke (GROSS et al, 1992). Cavalos Apaloosa podem ter alguma predisposição à doença (SCOTT, 1989).

O PF apresenta-se como uma dermatite exfoliativa geralmente simétrica, que pode ser localizada ou generalizada. Lesões mucocutâneas ou nas mucosas são raras. As lesões dos felinos ficam restritas à face, orelhas, espaços interdigitais e mamilos (GROSS et al, 1992). As lesões dos eqüinos se iniciam na face e afetam também a região coronária podálica. Tendem a se generalizar dentro de 1-3 meses (SCOTT, 1989).

Pústulas subcorneais amplas e discretas ou intragranulares largas e rasas, preenchidas com neutrófilos, eosinófilos e muitos acantócitos são os achados histológicos típicos do PF em cães (GROSS et al, 1992; SHINYA et al, 1996; SUTER et al, 1998) e eqüinos (SCOTT, 1989). As lesões vesiculares observadas em humanos não apresentam infiltrado de neutrófilos (SUTER et al, 1998).

Na imunofluorescência direta, pode haver fluorescência positiva para imunoglobulinas (IgG, IgM e esporadicamente IgA) nos espaços intercelulares suprabasais, e para o fragmento C3 do complemento. Resultados positivos são observados em até 70-80% dos casos (SUTER et al, 1998). Na imuno-histoquímica também é possível observar marcação suprabasal, intercelular na epiderme e no infundíbulo folicular (GROSS et al, 1992; SHINYA et al, 1996).

O diagnóstico deve levar em consideração a história, exame físico e a histopatologia. O teste de Tzanck é um exame complementar útil. Consiste de um esfregaço de pústulas intactas que revela células acantolíticas circundadas por neutrófilos com forma de engrenagem (CARLOTTI, 1989).

Pênfigo Eritematoso

É uma variante rara do PF que tem sido descrita no cão e no gato (CARLOTTI, 1989; GROSS et al, 1992). Pode ser considerada uma doença intermediária entre o PF e o

Lúpus Eritematoso Discóide (CARLOTTI, 1989). Caninos Collie e Pastor Alemão parecem mais predispostos à doença (GROSS et al, 1992).

O Pênfigo Eritematoso (PE) possui características clínicas semelhantes ao PF. Despigmentação do focinho e *planum nasale* e lesões foto-agravadas são particularidades do PE (GROSS et al, 1992). Na histopatologia, acantólise e pústulas subcorneais são semelhantes às observadas no PF. Em cães, o infiltrado dérmico pode ser liquenóide (CARLOTTI, 1989; GROSS et al, 1992), lembrando o lúpus eritematoso discóide (GROSS et al, 1992).

O diagnóstico leva em conta os mesmos critérios adotados para o PF. O teste de anticorpo antinuclear é moderadamente positivo e há IF positiva na zona da membrana basal (CARLOTTI, 1989).

Pênfigo Vulgar

O Pênfigo Vulgar (PV) é uma doença auto-imune rara em cães e gatos (CARLOTTI, 1989; GROSS et al, 1992). Afeta animais adultos e velhos. Não existe predileção por sexo ou raça (CARLOTTI, 1989). Como o PV é uma doença rara nos animais domésticos, poucos dados estão disponíveis (GROSS et al, 1992).

As lesões se caracterizam por bolhas e vesículas frágeis que desaparecem rapidamente dando origem a erosões e ulcerações das mucosas, junções mucocutâneas e pele. Os portadores demonstram sinal de Nikolsky positivo (CARLOTTI, 1989).

O achado histopatológico típico do PV é a fenda suprabasal. Há separação dos queratinócitos devido à acantólise, que leva à formação da bolha. As lesões podem se estender para os anexos, como folículos pilosos na pele e ductos salivares na mucosa oral. Inflamação não ocorre enquanto a bolha estiver intacta. Na derme há incontinência pigmentar e inflamação superficial, cuja severidade é determinada pela presença de ulceração (GROSS et al, 1992).

Microscopia eletrônica da pele e mucosas de portadores de PV demonstra que, no início do processo de separação, os desmossomos ainda apresentam uma área central eletrodensa. À medida que a acantólise progride, as estruturas dos desmossomos vão se desfazendo. Mesmo nos sítios de completa dissolução dos desmossomos o folheto externo da membrana plasmática permanece íntegro. As células da camada basal permanecem aderidas à derme, inclusive nas áreas acantolíticas, pois as estruturas da JDE se mantêm íntegras. Pode haver desprendimento das superfícies laterais dos queratinócitos basais. Em todas as camadas há o desprendimento e retração dos tonofilamentos (HASHIMOTO & LEVER, 1970).

Microscopia imuno-eletrônica demonstra que os desmossomos mesmo das células acantolíticas ainda apresentam imunomarcagem para Dsgs e placoglobina (TADA & HASHIMOTO, 1998).

Os testes de IF direta e imuno-histoquímica demonstram deposição trans-epidérmica de imunoglobulinas, geralmente IgG e ocasionalmente do fragmento C3 do complemento (CARLOTTI, 1989; GROSS et al, 1992).

Pênfigo Vegetante

O Pênfigo Vegetante (PVeg) é considerado na medicina humana, uma variante benigna do PV e apresenta os tipos Hallopeau e Neuman. A existência do PVeg na medicina veterinária é controversa embora tenha sido descrito em caninos. É possível, porém, que ele venha sendo confundido com o pênfigo pustular pan-epidérmico (SUTER et

al, 1998). Não foi verificada qualquer predisposição quanto a sexo, raça ou idade nos caninos (GROSS et al, 1992).

Inicialmente as lesões são vésico-pustulares (GROSS et al, 1992) evoluem para vegetações verrucosas e proliferações papilomatosas (CARLOTTI, 1989, GROSS et al, 1992).

Na histopatologia observa-se fenda suprabasilar, devido a acantólise, que envolve também os folículos pilosos superficiais. Além de pústulas foliculares com eosinófilos e células acantolíticas, há hiperplasia da epiderme e do epitélio folicular superficial (CARLOTTI, 1989; GROSS et al, 1992). A inflamação dérmica é superficial e mista, composta por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e plasmócitos (GROSS et al, 1992).

O diagnóstico é feito pela história, exame físico, histopatologia e IF direta (CARLOTTI, 1989). Diagnóstico diferencial deve considerar PV, Pioderma Profundo e PF profundo (GROSS et al, 1992).

Pênfigo Paraneoplásico

Em humanos o Pênfigo Paraneoplásico (PNP) é uma doença semelhante ao PV. Casos da doença foram descritos em caninos portadores de linfoma e tumor de células de Sertoli (SUTER et al, 1998).

O PNP é uma forma severa de pênfigo, resistente à terapia e que às vezes é fatal para os pacientes, mesmo que eles não venham a óbito em função da neoplasia. As alterações envolvem o epitélio da pele, mucosas e trato respiratório (SUTER et al, 1998).

Pênfigo Pustular Pan-epidérmico

Essa forma da doença foi descrita recentemente em caninos. A definição da entidade Pênfigo Pustular Pan-epidérmico (PPP) é baseada na localização da bolha na epiderme. Essa forma de pênfigo não é relatada em humanos (SUTER et al, 1998).

As lesões iniciam, à semelhança do PF, como pústulas transitórias, mas rapidamente evoluem para pápulas e placas cobertas por crostas espessas. O PPP é uma doença de caninos que abarca características do PE e do PVeg (tipo Hallopeau). Contudo, as características clínicas e testes imunopatológicos não eliminam a possibilidade da doença ser PE (SUTER et al, 1998).

Na histopatologia são observadas pústulas com acantólise no epitélio estratificado escamoso e na bainha infundibular externa, abaixo dos níveis suprabasais. Há marcada hiperplasia com muitas pústulas intra-epidérmicas, contendo acantócitos e eosinófilos, nas diferentes camadas do epitélio (SUTER et al, 1998).

Nos poucos casos em que testes imunopatológicos foram realizados, os resultados foram semelhantes aos observados para o PF (SUTER et al, 1998).

Antígenos

Cada forma de pênfigo tem seu próprio antígeno alvo, embora nos últimos anos tenha-se observado que certas populações de auto-anticorpos não ficam restritos a uma forma de pênfigo (Quadro 2).

Quadro 2 - Formas de pênfigo e antígenos associados (ANHALT, 1999; COZZANI et al, 2000).

Local no desmossomo	Antígeno	Formas
Placa	Desmoplaquina I	Pênfigo Paraneoplásico

(proteínas não-glicosiladas)	Desmoplaquina II	Pênfigo Paraneoplásico
	Plectina	Pênfigo Paraneoplásico
	Envoplaquina	Pênfigo Paraneoplásico
	Periplaquina	Pênfigo Paraneoplásico
Desmoglea (proteínas glicosiladas)	Desmogleína 1	Pênfigo Foliáceo Pênfigo Paraneoplásico
	Desmogleína 3	Pênfigo Vulgar (mucosas) Pênfigo Foliáceo Pênfigo Paraneoplásico
	Desmogleína 1 e 3	Pênfigo Vulgar (mucosas e pele)
	Desmocolina 1	Pênfigo Vulgar Pênfigo Foliáceo
	Desmocolina 2	Pênfigo Vulgar Pênfigo Foliáceo

O PF em humanos está associado com anticorpos anti-Dsg1 (MARINKOVICH, 1995). A mesma estrutura tem sido identificada como antígeno em caninos. Na forma Brasileira do PF (Fogo Selvagem), detectada em humanos, além da Dsg1, as Dsc1 e 2 também são alvo de anticorpos. Ainda não foram identificadas as estruturas antigênicas do PE, seja para humanos ou caninos (SUTER et al, 1998).

O principal antígeno reconhecido, em humanos, como alvo de auto-anticorpos no PV é a caderina desmossômica Dsg3, com 130kDa. Adicionalmente, cerca de 50% dos soros de portadores de PV reagem com domínios intracelulares da Dsg1 e raros reagem com Dsc1 e 2. (HASHIMOTO et al, 1994). Auto-anticorpos de humanos fazem reações cruzadas com outras espécies e reconhecem o antígeno de 130Kda de caninos (SUTER et al, 1998).

O PNP humano é caracterizado pela presença de anticorpos que imunoprecipitam o Antígeno do Penfigóide Bolhoso (BPAg)-1 (BP230) (MARINKOVICH, 1995), DP I e II (SUTER et al, 1998), periplaquina, envoplaquina, BPAg1, Dsg3 e outro antígeno não identificado de 170kDa (MUSETE et al, 2000). O soro canino de PNP reage com DP I e II e com a Dsg1 (SUTER et al, 1998).

O antígeno do PPP foi demonstrado apenas num cão. Através de *Western Blot* foi demonstrado que o soro reagiu com a banda Dsg1 de extratos do lábio canino e do focinho bovino (SUTER et al, 1998).

Os auto-anticorpos geralmente são isotípicos, no PF, no PV e no PNP. Mesmo que a resposta se direcione contra antígenos diferentes, para cada um será produzido somente um determinado isotipo de anticorpo. Os anticorpos humanos geralmente são IgG4 policlonais (MUSETE et al, 2000).

A caracterização dos principais antígenos das diferentes formas de pênfigo é importante para o aprimoramento das técnicas de diagnóstico disponíveis. Mesmo que alguns dos antígenos tenham sido claramente identificados, deve-se considerar a heterogeneidade ou indisponibilidade de alguns epítomos desses antígenos. Isso pode explicar, por exemplo, alguns resultados negativos em provas de IF indireta ao utilizar-se esôfago de macaco como substrato. Os resultados podem ser melhores quando o substrato é trocado por tecido de lábio canino (SUTER et al, 1998).

Etiopatogenia

A etiologia do pênfigo ainda é desconhecida. A produção de auto-anticorpos pode ser consequência de falhas nos mecanismos de regulação do sistema imunitário ou de estimulação antigênica inadequada (SUTER et al, 1998). Doenças bolhosas ocorrem em pacientes com neoplasias em função da quebra nos mecanismos de tolerância a múltiplos antígenos epidérmicos (MUSETE et al, 2000).

É possível que agentes infecciosos atuem no desenvolvimento do pênfigo. Isso foi postulado devido à associação do PVeg tipo Neumam dos humanos com listeriose. A indução ou exacerbação do pênfigo devido ao uso de drogas, como a penicilamina, ampicilina e rifampicina, já foi comprovada. Prenhez também tem sido relacionada com o aparecimento do pênfigo (SUTER et al, 1998).

Os mecanismos de formação da bolha ainda não foram esclarecidos. A ligação de auto-anticorpos a caderinas leva à ativação dos queratinócitos, através dos meios de sinalização intracelular. A consequência da ativação dos queratinócitos é a perda da adesão intercelular, levando a acantólise. Vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo (SUTER et al, 1998). Estudos recentes demonstram que a fosfolipase C pode desempenhar um papel importante na sinalização trans-membrana, levando a perda da adesão celular. A ligação da IgG do pênfigo induz apoptose na pele lesada e em culturas de queratinócitos e órgãos (HERTL, 2000).

Proteases relacionadas com ativador plasminogênio uroquinase (uPA) convertem plasminogênio em plasmina, a qual digere as estruturas das moléculas de adesão causando a perda da coesão célula-célula (JORDON et al, 1985; HERTL, 2000). É possível também, que esse seja um fenômeno secundário na formação das bolhas (SUTER et al, 1998).

O sistema complemento também pode estar envolvido no processo, já que anticorpos do pênfigo ativam complemento pela via clássica. Como estudos *in vitro* demonstram a formação de bolhas na ausência do complemento, é possível que esse seja somente um mecanismo adicional ao mecanismo primário (JORDON et al, 1985; SUTER et al, 1998).

A hipótese mais provável considera o fato de que os desmossomos são estruturas dinâmicas, e como tal, sujeitas a processos contínuos de agregação e desagregação, que capacitam os queratinócitos a migrar da camada basal até a camada córnea durante a sua diferenciação. É provável que a ligação dos anticorpos aos componentes desmossômicos determine a quebra dos sistemas de controle desses processos através de mecanismos ainda desconhecidos (SUTER et al, 1998). Os auto-anticorpos poderiam ainda inibir diretamente a função adesiva das desmogleínas (KOCH et al, 1997).

O papel dos neutrófilos típicos das lesões de caninos e ausentes nas lesões de humanos ainda não foi esclarecido. Os queratinócitos de caninos e humanos podem reagir de modo diferente à ligação dos anticorpos. No mesmo contexto, é possível que as citocinas dos neutrófilos contribuam para acantólise nos caninos (SUTER et al, 1998). Mesmo em humanos, o papel das células inflamatórias requer mais estudos (JORDON et al, 1985).

O sítio de formação da bolha e o tipo de epitélio afetado dependem do perfil de auto-anticorpos formados (COZZANI et al, 2000) e da distribuição do antígeno-alvo no epitélio (Figura 7). Na forma inicial do PV, se formam auto-anticorpos contra a Dsg3,

que se localiza especialmente nas camadas mais profundas da epiderme. Dessa forma, predominam ocorrem bolhas profundas na pele (ANHALT, 1999).

Já no PF, os auto-anticorpos típicos são dirigidos contra a Dsg1, que é uma caderina importante para as camadas superficiais da epiderme. Assim sendo, predominam as lesões cutâneas superficiais (ANHALT, 1999).

A co-expressão da Dsg 1 e 3 em alguns queratinócitos protege contra o dano induzido por anticorpos exclusivamente contra um desses componentes (COZZANI et al, 2000). Em alguns locais, há predomínio de apenas uma isoforma de Dsg num determinado nível do epitélio. Se essa isoforma for o alvo do auto-anticorpo, ocorrerá a lesão. Isso ocorre no PV que afeta a mucosa oral de humanos. Nesse sítio, a Dsg3 é intensamente expressa e a Dsg1 não é suficiente para compensar a perda da coesão determinada pelos anticorpos anti-Dsg3 (COZZANI et al, 2000). Já no PF, anticorpos anti-Dsg1 sozinhos não são capazes de causar bolhas na mucosa oral (ANHALT, 1999; COZZANI et al, 2000).

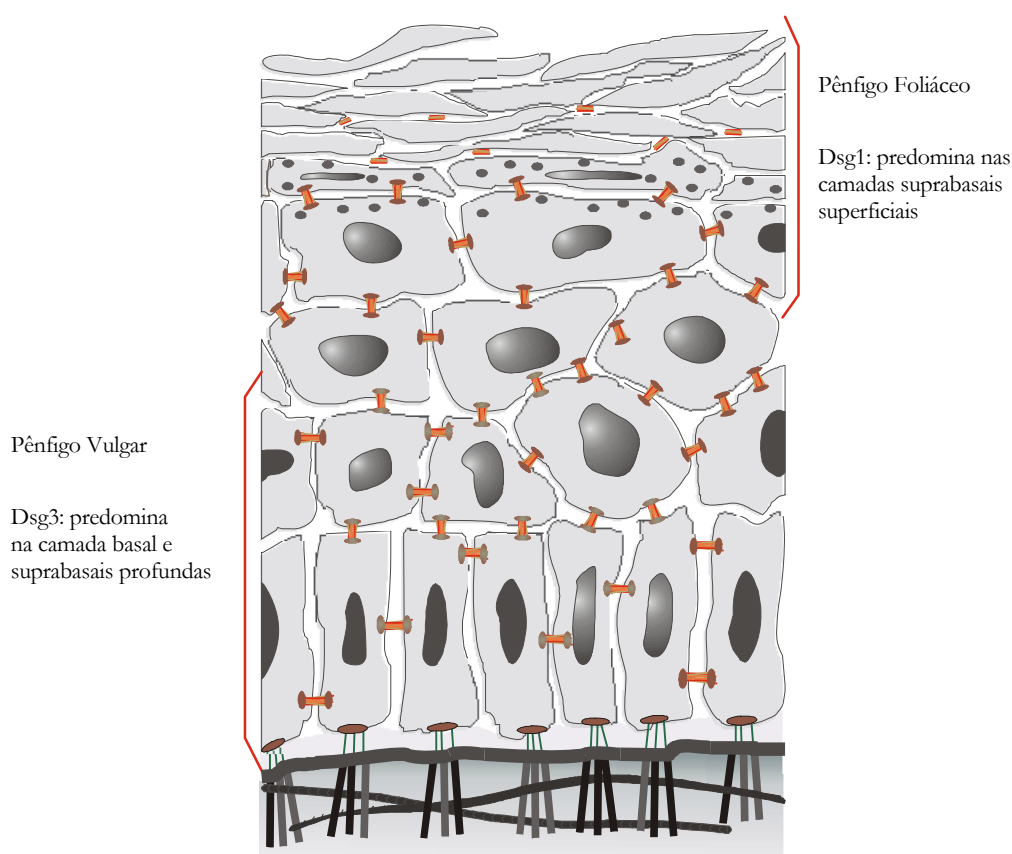


Figura 7 - Representação da localização dos principais antígenos do pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar na epiderme.

Embora seja comum aceitar que cada tipo de pênfigo possui seu próprio antígeno-alvo, sabe-se que determinados auto-anticorpos não são específicos para uma única forma da doença. Alguns deles podem representar apenas a quebra adicional da tolerância dos linfócitos B a outros componentes dos complexos juncionais, o que caracteriza o fenômeno de “expansão antigênica” (COZZANI et al, 2000). Com a evolução da

doença, são produzidos anticorpos contra moléculas de estrutura similar ao primeiro antígeno ou contra moléculas diferentes, mas fisicamente próximas a ele (CRAFT & FATENEJAD, 1997). Assim se explica o aparecimento das lesões cutâneas no PV. Elas ocorrem quando se formam auto-anticorpos adicionais contra a Dsg1. Nesse caso, além das lesões nas mucosas, também se desenvolvem lesões cutâneas (ANHALT, 1999).

Doença de Darier

A Doença de Darier é uma genodermatose autossômica dominante (WEEDON, 1997), de penetrância variável (SCHANNE et al, 1985). Caracteriza-se pela perda de coesão dos queratinócitos e queratinização anormal (SAKUNTABHAI et al, 1999b). Observam-se pápulas e pápulo-vesículas crostosas e oleosas, principalmente em áreas seborréicas da cabeça, tronco, peito e pescoço (SCHANNE et al, 1985; WEEDON, 1997). As lesões se desenvolvem lentamente e não ocorrem em função de traumatismos leves (BURGE & SCHOMBERG, 1992).

A diferenciação histológica da Doença de Darier é difícil, pois ela compartilha várias características com outras doenças, em especial com a Doença de Hailey-Hailey. Na Doença de Darier típica observam-se células disqueratóticas, como corpos arredondados ou granulares, nas camadas superficiais da epiderme (SCHANNE et al, 1985; WEEDON, 1997). À medida que a doença evolui, são observadas acantose, papilomatose e hiperqueratose. Há formação da fenda suprabasal, juntamente com acantólise (SCHANNE et al, 1985).

Na microscopia eletrônica observa-se formação de material disqueratótico. Há dissolução dos tonofilamentos e desmossomos. Os tonofilamentos se aglutinam na região perinuclear. O núcleo desaparece. Esporadicamente há queratinização defeituosa no citoplasma (grânulos) (SCHANNE et al, 1985). As lesões podem ser dolorosas e acompanhadas de prurido (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992).

IF direta não revela qualquer deposição de imunoglobulinas ou complemento (SCHANNE et al, 1985; WEEDON, 1997).

Mutações que afetam as bombas de cálcio dos queratinócitos são os fatores determinantes da doença de Darier (MISSIAEN et al, 2000). É causada por defeitos no gene ATP2A2 do cromossomo 12q23-24.1 humano (SAKUNTABHAI et al, 1999a). Esse gene codifica a isoforma 2 da ATPase Ca^{2+} do retículo sarco/endoplasmático (SAKUNTABHAI et al, 1999a, b), a qual é amplamente expressa nos queratinócitos (SAKUNTABHAI et al, 1999a). Foram identificados 33 tipos diferentes de mutações.

Como a perda da coesão entre as células da epiderme deve envolver alterações de um ou mais componentes das junções adesivas ou dos desmossomos, vários estudos através de imuno-histoquímica e IF são realizados visando identificar essas alterações. Anticorpos são utilizados para determinar a localização celular de caderinas desmossômicas como Dsg1 (BURGE & GARROD, 1991; HAKUNO et al, 2000), Dsg2 (BURGE & GARROD, 1991; HAKUNO et al, 2000), Dsg3 (HAKUNO et al, 2000) e Dsc (BURGE & GARROD, 1991; HAKUNO et al, 2000); proteínas da placa desmossômica como DPs, placofilina (HAKUNO et al, 2000) e placoglobina (BURGE & SCHOMBERG, 1992; HAKUNO et al, 2000); ou ainda proteínas associadas às junções adesivas entre as quais estão a E-caderina (BURGE & SCHOMBERG, 1992; HAKUNO et al, 2000), α -catenina e β -catenina (HAKUNO et al, 2000).

Nas áreas perilesionais há expressão normal de DpI e DpII, assim como de Dsg1, Dsc2-3, placoglobina e E-caderina (BURGE & GARROD, 1991; BURGE &

SCHOMBERG, 1992). Microscopia imuno-eletrônica indica uma concentração menor de placoglobina nessas áreas (TADA & HASHIMOTO, 1998).

Avaliação pela imuno-histoquímica (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992) e microscopia imuno-eletrônica (TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000) demonstra, de um modo geral, que os componentes desmossômicos se dispersam pelo citoplasma (BURGE & SCHOMBERG, 1992; TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000), enquanto que as estruturas das junções adesivas ficam mais restritas à periferia e se difundem apenas parcialmente no citoplasma (TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000).

Essas alterações, embora secundárias à acantólise certamente têm importância na patofisiologia da doença (HAKUNO et al, 2000). Provavelmente as alterações não refletem deficiência na síntese de proteínas das junções (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992).

Considerando que as junções em gap são importantes na coordenação do comportamento dos queratinócitos no tecido, alguns de seus componentes (conexinas 26 e 43 de humanos) foram avaliados na doença de Darier. A acantólise não determina desmantelamento da junção. Seus componentes sofrem internalização e se dispersam no citoplasma. Esses eventos são secundários à perda de coesão (HAFTEK et al, 1999), à semelhança do que ocorre com os componentes estruturais dos desmossomos e das junções adesivas.

Doença de Hailey-Hailey

A Doença de Hailey-Hailey é uma dermatose hereditária, também é conhecida como pênfigo familiar crônico benigno. Além de acometer humanos, a doença foi descrita em caninos (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992; SUEKI et al, 1997). Nos casos relatados nos caninos, a doença acometeu um macho Setter Irlandês (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992) e uma fêmea (SUEKI et al, 1997). A progênie dos animais afetados em ambos os casos também desenvolveu a doença (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992; SUEKI et al, 1997).

A doença apresenta-se como uma desordem vesicular exsudativa e crostosa que afeta axilas, virilhas, e dorso do pescoço (SCHANNE et al, 1985; WEEDON, 1997). Os pacientes demonstram extrema fragilidade da epiderme e as lesões são secundárias a traumatismos leves (BURGE & SCHOMBERG, 1992).

As lesões iniciais caracterizam-se por fendas suprabasais, delimitadas com células acantolíticas, as quais também se encontram dentro da fenda (WEEDON, 1997). O teto da bolha é constituído pela porção superficial do estrato espinhoso, dos estratos granuloso e córneo, o qual pode estar paraqueratótico (SCHANNE et al, 1985). Há acantólise marcada envolvendo quase todos os estratos da epiderme, e lhe dando a aparência de muro dilapidado, característica da doença. A camada basal permanece íntegra (SCHANNE et al, 1985; SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992; WEEDON, 1997). Hiperplasia da epiderme, e infiltrado linfo-histiocitário dérmico também estão presentes (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992).

Embora a Doença de Hailey-Hailey compartilhe algumas características histológicas com a doença de Darier, ela apresenta raramente os corpúsculos arredondados ou granulados da segunda. Além disso, a acantólise na doença de Hailey-Hailey é mais intensa (SCHANNE et al, 1985; SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992; WEEDON, 1997).

Na microscopia eletrônica observa-se que as células acantolíticas desenvolvem numerosas projeções filamentosas bizarras que se assemelham a microvilos (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970; SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992). Esse fenômeno precede o aumento dos espaços intercelulares e as alterações nos complexos desmossomos-tonofilamentos do estrato espinhoso (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970). Pode haver diminuição no número (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992) ou desaparecimento total desses complexos (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970).

Há retração dos tonofilamentos que aparecem eletrodensos (SCHANNE et al, 1985) e formando agregados em torno do núcleo. As células basais apresentam alguma redução no grau de adesão das suas superfícies laterais e apicais. A superfície basal mantém sua capacidade de adesão através dos hemidesmossomos normais (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970).

IF direta é negativa para imunoglobulinas e complemento na doença de Hailey-Hailey (SCHANNE et al, 1985; WEEDON, 1997).

A doença é hereditária de caráter autossômico recessivo e penetrância variável (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970; SCHANNE et al, 1985). É provável que mutações no gene ATP2C1 do cromossomo 3q21 humano causem doença (HU et al, 2000; SUDBRAK et al, 2000). O ATP2C1 codifica uma classe de ATP-ase transportadora- Ca^{2+} tipo-P. Ela é homóloga da SPLA de ratos (SUDBRAK et al, 2000) e da PMR1 de leveduras (HU et al, 2000), as quais são bombas de Ca^{2+} do Complexo de Golgi e relacionadas com as famílias de bombas de Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático e ATPase da membrana plasmática. Foram identificados pelo menos 13 tipos diferentes de mutações nesse gene (SUDBRAK et al, 2000).

Como na Doença de Darier, o principal fator determinante da doença de Hailey-Hailey é a série de mutações que afetam as bombas de cálcio dos queratinócitos (MISSIAEN et al, 2000). Certamente, mais estudos são necessários para definir o papel do Ca^{2+} na sinalização e manutenção da integridade celular (SUDBRAK et al, 2000). Assim, patogenia da doença ainda não foi esclarecida. É possível que alterações ocorram nas junções adesivas e nos desmossomos (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992).

Os estudos de imuno-histoquímica e de IF para caderinas e proteínas das placas desmossômicas, e para proteínas das junções adesivas foram realizados, também, na doença de Hailey-Hailey (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992; HAKUNO et al, 2000). De um modo geral, a marcação tanto para as regiões perilesionais como para células acantolíticas seguiu o mesmo padrão que na doença de Darier (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992; TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000). Além do que já foi relatado, podem ocorrer, também, aglomerados de placoglobina na periferia de algumas células acantolíticas (BURGE & SCHOMBERG, 1992).

Avaliação pela microscopia imuno-eletrônica demonstra que, como na Doença de Darier, os componentes do desmossomo estão dispersos no citoplasma, enquanto que as estruturas das junções adesivas estão mais restritas à periferia (TADA & HASHIMOTO, 1998).

Esses achados indicam que a acantólise precede o desenvolvimento da marcação intracelular. Na Doença de Hailey-Hailey assim como na doença de Darier, a internalização de componentes dos desmossomos deve ser um fenômeno secundário à acantólise (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992).

Durante a acantólise também ocorre o desprendimento de conexinas das junções em gap, que são internalizadas e se dispersam no citoplasma. Esse destino de proteínas e estruturas é, provavelmente, um processo de reciclagem, também usado por queratinócitos normais durante a organogênese e a diferenciação tecidual (HAFTEK et al, 1999).

Acantólise Familiar dos Bovinos Angus

A doença de caráter hereditário acomete bovinos da raça Aberdeen Angus e provavelmente tem caráter autossômico recessivo. Os animais apresentam lesões ulcerativas e exsudativas da pele que reveste as extremidades e na banda coronária do casco. Pode ocorrer perda dos cascos. Úlceras irregulares são observadas também na mucosa da língua, palatos duro e mole, gengiva e porção proximal do esôfago (JOLLY et al, 1973).

Histologicamente observa-se uma dermatite vesicular intra-epitelial. Nas áreas de lesão o epitélio remanescente está intacto ou apresenta degeneração e acantólise das células espinhosas. Nas áreas afetadas, numerosas células de todos os estratos contêm grandes corpúsculos intracitoplasmáticos eosinofílicos (JOLLY et al, 1973).

Na microscopia eletrônica observa-se que Acantólise Familiar dos Bovinos Angus caracteriza-se pela separação entre células basais e espinhosas ou ainda pela separação dos queratinócitos basais e JDE. Em geral os hemidesmossomos estão íntegros, os desmossomos estão ausentes e há algumas vilosidades na membrana dos queratinócitos (JOLLY et al, 1973).

Queratoderma Palmoplantar Hereditário

Os Queratodermas Palmoplantares Hereditários (QPH) compõem um ramo confuso de genodermatoses em humanos. A doença caracteriza-se por hiperqueratose das palmas das mãos e solas dos pés. Por outro lado, está associada à predisposição genética a outras condições como perda da audição, falência cardíaca e câncer (KELSELL & STEVENS, 1999).

A patogenia desse grupo de doenças ainda não foi esclarecida. Algumas formas se devem a defeitos nos filamentos de queratina (KELSELL & STEVENS, 1999). Outras formas podem estar relacionadas com defeitos numa região de 650-kb do locus 18q12.1 do cromossomo 18 humano e que corresponde aos genes das caderinas desmossômicas. Essas alterações foram observadas na forma estriada. Defeitos na placofilina-1 talvez também possam estar envolvidos no problema (McGRATH, 1999).

Síndrome da Fragilidade da Pele/Displasia Ectodérmica

A doença foi diagnosticada em humanos e caracteriza-se por vermelhidão da pele e pela presença de bolhas nas solas dos pés e perda da pele nas palmas das mãos em neonatos. À medida que os doentes crescem, passam a apresentar erosões cutâneas, pêlos escassos, unhas distróficas e lesões quebradiças e dolorosas nas palmas das mãos e solas dos pés (McGRATH, 1999; WHITTOCK et al, 2000).

Na histologia foi observado espessamento da epiderme e ampliação dos espaços intercelulares entre queratinócitos, a partir da primeira camada suprabasal. A microscopia eletrônica demonstra perda de coesão dos queratinócitos, sem citólise. Os tonofilamentos aparecem condensados em torno do núcleo e sem conexão com os desmossomos (McGRATH, 1999).

Biópsias de pele demonstram imunomarcagem negativa para antiplacofilina-1 (Figura 8) em pacientes portadores da doença (McGRATH, 1999; WHITTOCK et al, 2000).

Estudos com reação de polimerase em cadeia demonstraram que a doença resulta de mutações no gene da placofilina-1 (WHITTOCK et al, 2000).

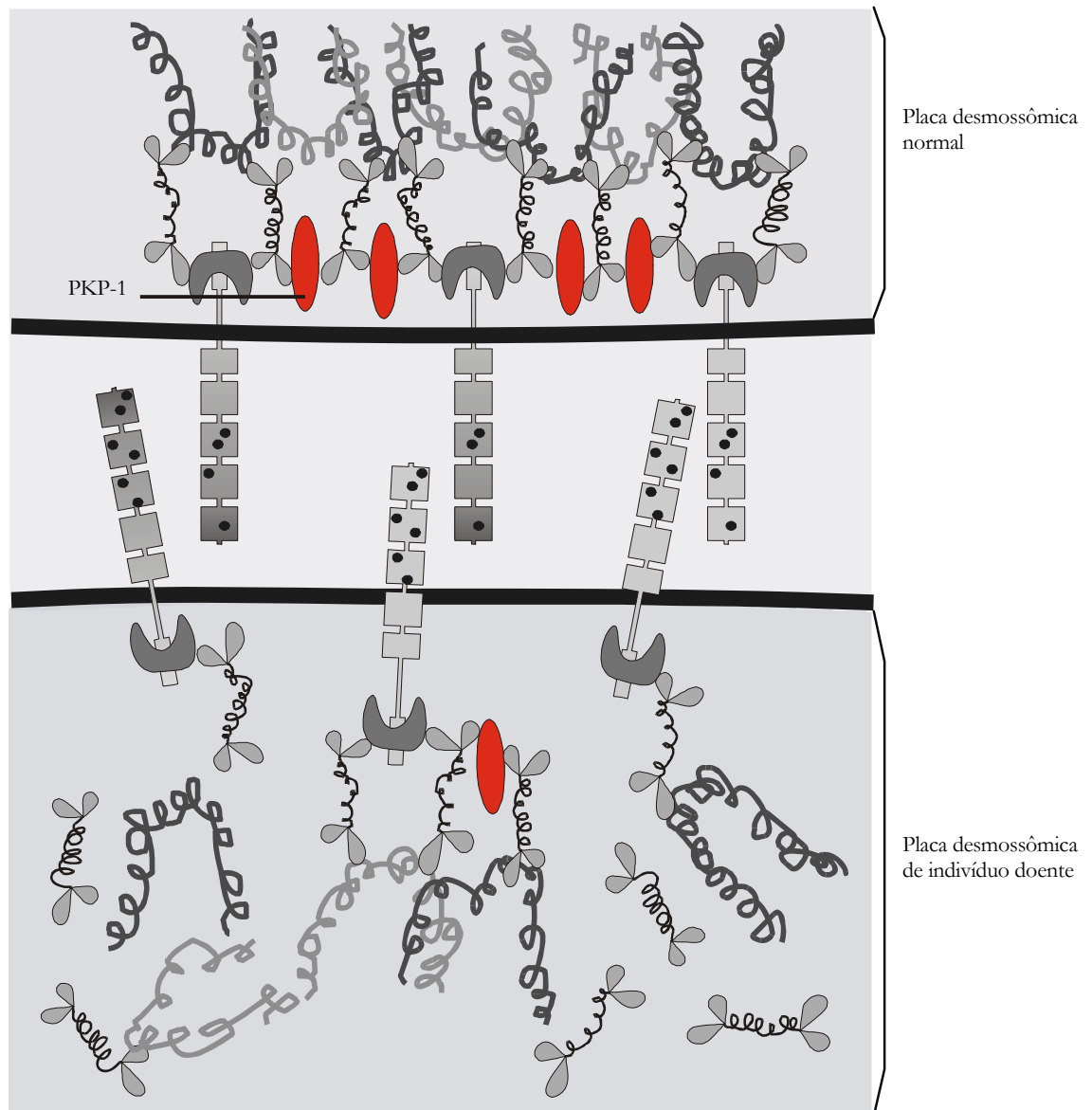


Figura 8 - Esquema representando a placa desmossômica de um indivíduo normal (porção superior do desenho) e de um portador da Síndrome da Fragilidade da Pele/Displasia Ectodérmica (porção inferior do desenho), onde nota-se total desorganização da placa e perda da estabilidade entre as proteínas, a qual que determina a perda da coesão entre caderinas e o desprendimento das células. PKP-1: placofilina-1.

Genodermatose Mecanobolbosa em Búfalos Murrah

A doença foi diagnosticada pela primeira vez num rebanho de búfalos da raça Murrah pertencente à EMBRAPA-CPACT. Este rebanho começou a ser formado em 1981, com o touro Cafre RD¹136 e 25 vacas provenientes do estado do Pará. Em 1982 foram introduzidas mais 25 vacas vindas do Paraná. Em 1985 foi introduzido o touro Ghusrã da Rothak RD 27 e em 1988 foram adquiridos os touros Cossaco RD 613 e Feitoso da Campestre RD 278. Esses 3 touros foram adquiridos no estado de São Paulo (FERNANDES et al, 1996).

Devido a dificuldades para aquisição de reprodutores, o touro Cafre RD136 foi acasalado com 17 de suas filhas. Como resultado desses cruzamentos, nasceram em 1987 e em 1989 os dois primeiros animais acometidos pela doença, ambos do sexo masculino (FERNANDES et al, 1996). Em 1991 nasceram mais dois animais afetados, sendo um macho e uma fêmea. Eles resultaram do cruzamento entre o touro Cossaco RD 613 com 15 filhas de Cafre RD 136 (RIET-CORREA et al, 1994; FERNANDES et al, 1996).

Todos os portadores da doença detectados no rebanho da EMBRAPA-CPACT são filhos e/ou netos dos touros Cossaco RD 613 e Cafre RD 136. Nenhum animal afetado descende dos touros Ghusrã da Rothak RD 27 ou Feitoso da Campestre RD 278. Os touros Cossaco RD 613 e Cafre RD 136 possuem como antepassado comum o Touro Andad da Cachoeira RD 01, que foi importado da Índia antes de 1962, ano no qual o Ministério da Agricultura do Brasil proibiu a importação de novos animais (FERNANDES et al, 1996).

A avaliação genealógica (Figura 9) evidencia claramente que a doença tem caráter hereditário e é determinada por um gene autossômico recessivo (RIET-CORREA et al, 1994; FERNANDES et al, 1996).

¹ RD: Registro Definitivo

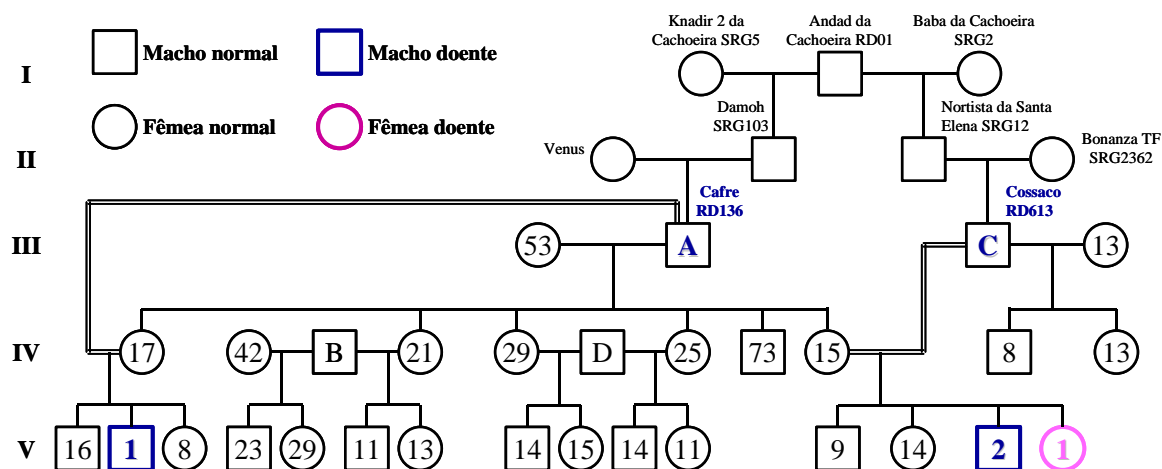


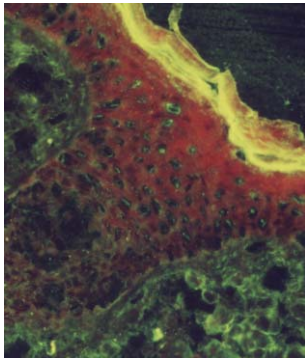
Figura 9 - Heredograma dos animais portadores da Genodermatose Mecanobolhosa nascidos na EMBRAPA-CPACT.

A doença se manifesta logo nos primeiros dias de vida dos animais. Eles apresentam fragilidade da pele, pêlos e estojos córneos dos cascos e chifres. O sinal clínico mais evidente é a ocorrência de escarificações e desprendimento dos estojos córneos em função de traumatismos triviais, que ocorrem quando os animais são laçados, se batem em cercas ou até em outros animais, como a própria mãe quando vão ser amamentados (RIET-CORREA et al, 1994; FERNANDES et al, 1996).

Clinicamente, há desprendimento da pele secundário a traumatismos. Histologicamente são observadas fendas e vesículas suprabasais, acompanhadas por acantólise que afeta também o infundíbulo dos folículos pilosos. A camada de células basais aparece intacta como uma camada de células cuboidais presas à epiderme (RIET-CORREA et al, 1994).

Estudos preliminares de microscopia eletrônica de transmissão revelam a manutenção da integridade das junções célula-matriz. Por outro lado, a região entre o estrato basal e o estrato espinhoso profundo apresenta perda de coesão entre os queratinócitos (RIET-CORREA et al, 1994).

Material e Métodos



MATERIAL E MÉTODOS

Rebanho Experimental de Portadores da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah

O rebanho experimental consanguíneo começou a ser implantado em abril de 1994 nas instalações da EMBRAPA-CPACT e foi mantido até 1999. Foram utilizados animais de propriedade da EMBRAPA-CPACT e que possuíam parentesco com os primeiros animais portadores da doença.

O rebanho iniciou com oito búfalas filhas do touro Cafre RD136 e um macho, denominado de 156. Este touro nasceu do cruzamento do touro Cossaco RD613 com uma filha do touro Cafre RD136.

Em agosto de 1995, foram incluídas doze novas fêmeas no rebanho. Elas eram filhas do touro Cossaco RD613. Seis delas eram também netas do touro Cafre RD136.

O touro 156 teve que ser afastado do rebanho experimental por ter brigado com outro reprodutor. Ele foi então substituído pelo touro 78, que era filho do touro Cossaco RD613.

Assim sendo foram realizados cruzamentos entre as vinte vacas e os dois touros. Como se pôde observar, todos eram descendentes dos touros Cossaco RD613 e Cafre RD136 (Figura 10), que comprovadamente eram heterozigotos para o gene que determina a Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah.

O rebanho experimental foi mantido durante 3 períodos reprodutivos, durante os quais nasceram 49 animais (28 machos e 21 fêmeas). Dentre esses, 12 animais eram portadores de doenças hereditárias, sendo elas: Artrogripose (5 búfalos), Hiperplasia Muscular (3 búfalos) e Genodermatose Mecanobolhosa (4 búfalos).

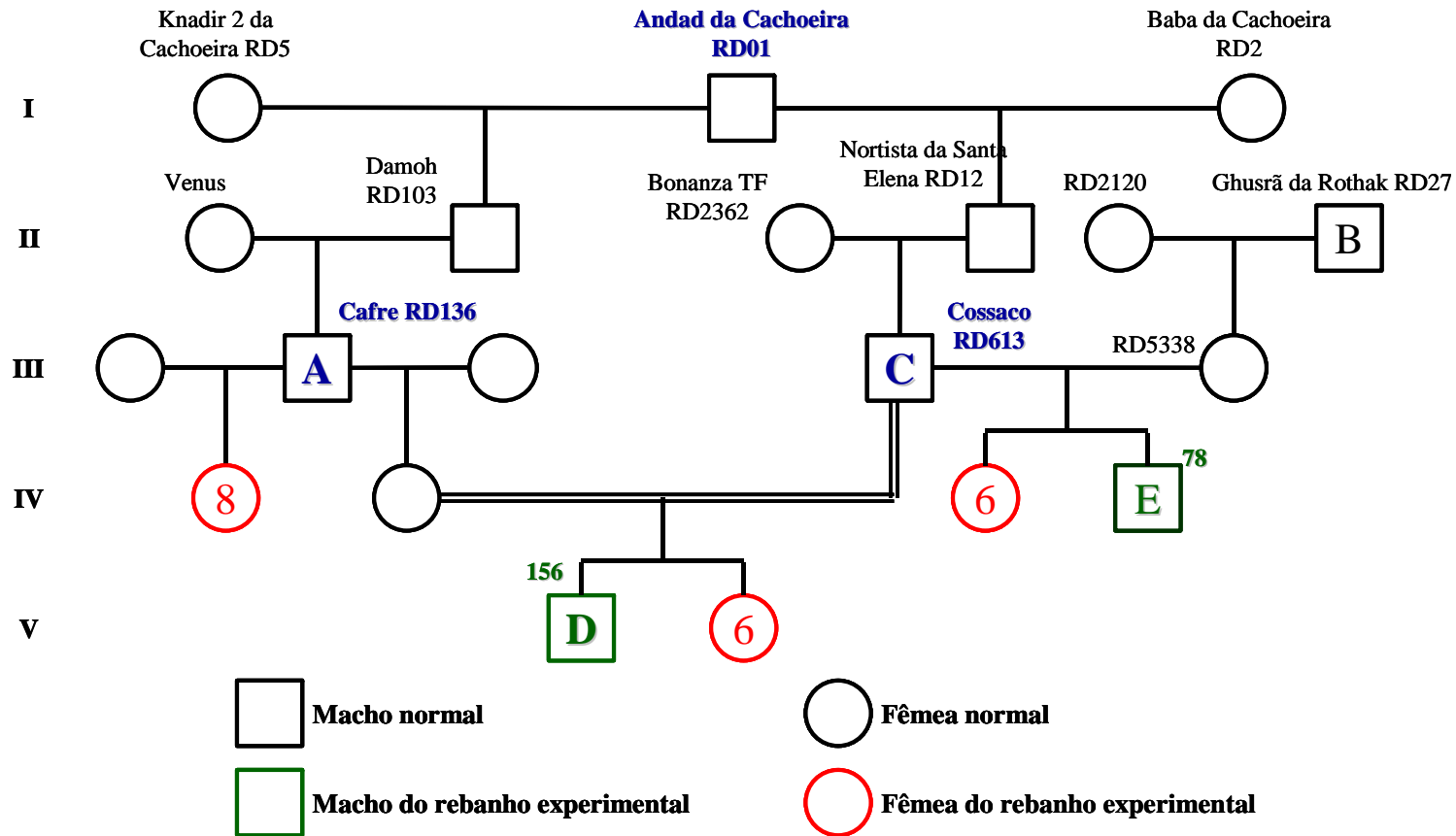


Figura 10 - Heredograma dos animais incluídos no rebanho experimental consanguíneo. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho incluído no rebanho experimental e círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental.

O Touro 156 teve 40 filhos (26 machos e 14 fêmeas) e o touro 78 teve 9 filhos (4 machos e 5 fêmeas). Dos 11 animais que nasceram com doenças hereditárias, oito búfalos eram filhos do 158. Os outros 3 animais com doenças hereditárias eram filhos do touro 78. Todos estes dados estão detalhados no Quadro 3.

Quadro 3 - Animais sadios e doentes obtidos no rebanho experimental em cada período reprodutivo enquanto o rebanho experimental consanguíneo foi mantido.

Período reprodutivo (anos)	Total de nascimentos (M-F)	Progênie portadora de doenças hereditárias		
		Doença	Sexo	Filiação (M-F)
1995/1996	11 (08-03)	Artrogrípese	M	156-133
		Hiperplasia Muscular	M	156-NC
1996/1997	20 (10-10)	Hiperplasia Muscular	M	156-NC
		Artrogrípese	M	156-NC
		Artrogrípese	M	156-NC
		Genodermatose Mecanobolhosa (655)	M	78 - 406
1997/1998	18 (10-08)	Hiperplasia Muscular	M	156-NC
		Artrogrípese	M	156-NC
		Artrogrípese	F	156-NC
		Genodermatose Mecanobolhosa (678)	F	78 - 303
		Genodermatose Mecanobolhosa (703)	F	156 - 411
		Genodermatose Mecanobolhosa (723)	M	78 - 133

Abreviaturas: M: macho; F: fêmea; NC: não consta

Os 4 portadores da Genodermatose Mecanobolhosa (Quadro 4), produtos de cruzamentos consanguíneos entre descendentes de Andad da Cachoeira RG01 (Figuras 11, 12, 13 e 14) foram utilizados neste trabalho.

Quadro 4 - Detalhes sobre os búfalos utilizados nesse experimento.

Búfalo	Data nascimento	Sexo	Filiação (M-F)
655	05/07/97	M	78 - 406
678	06/02/98	F	78 - 303
706	18/03/98	F	156 - 411
723	25/05/98	M	78 - 133

Abreviaturas: M: macho; F: fêmea.

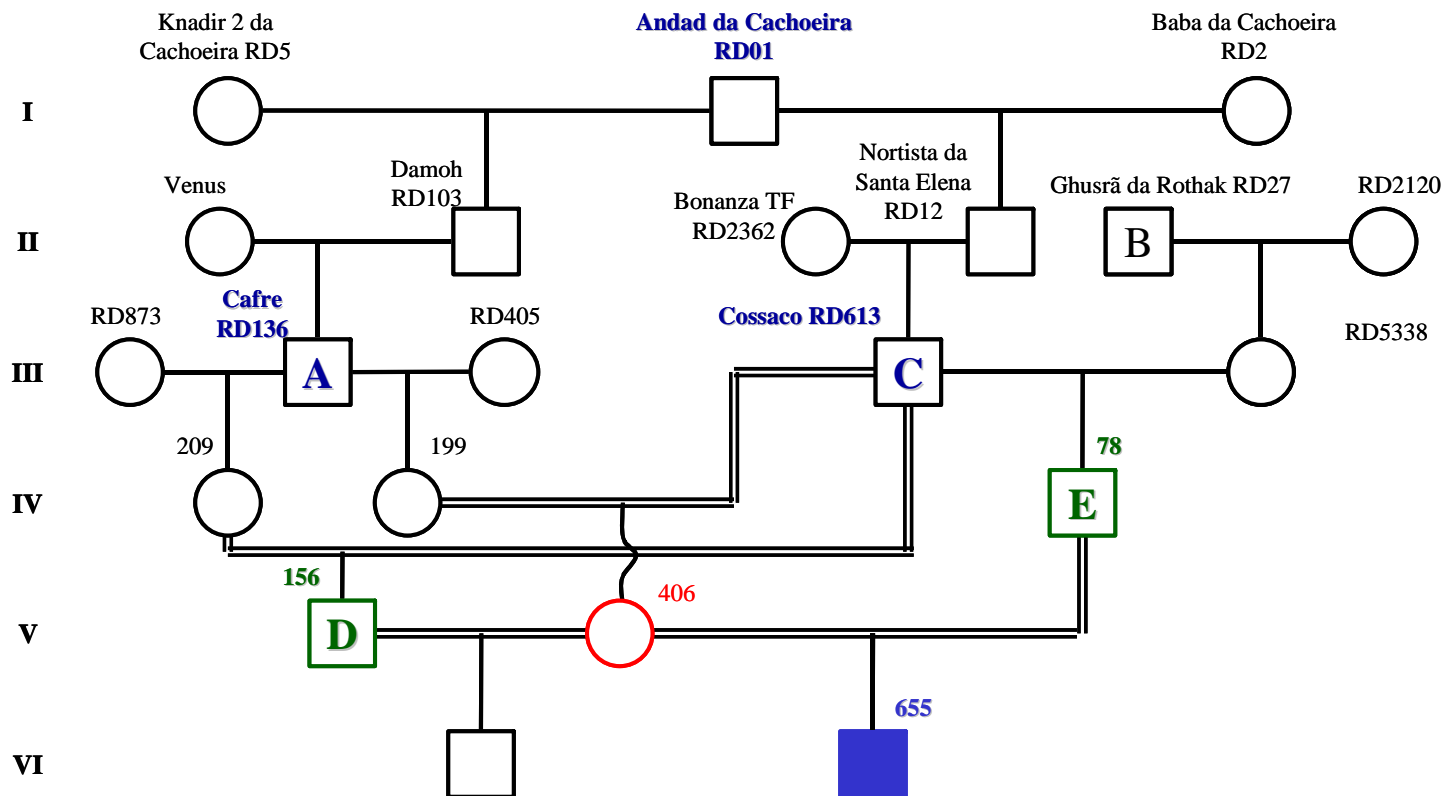


Figura 11 - Heredograma do primeiro animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 655. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental; quadrado azul preenchido: macho com a Genodermatose. Os nomes grifados em azul indicam touros heterozigotos para o gene que determinou a doença.

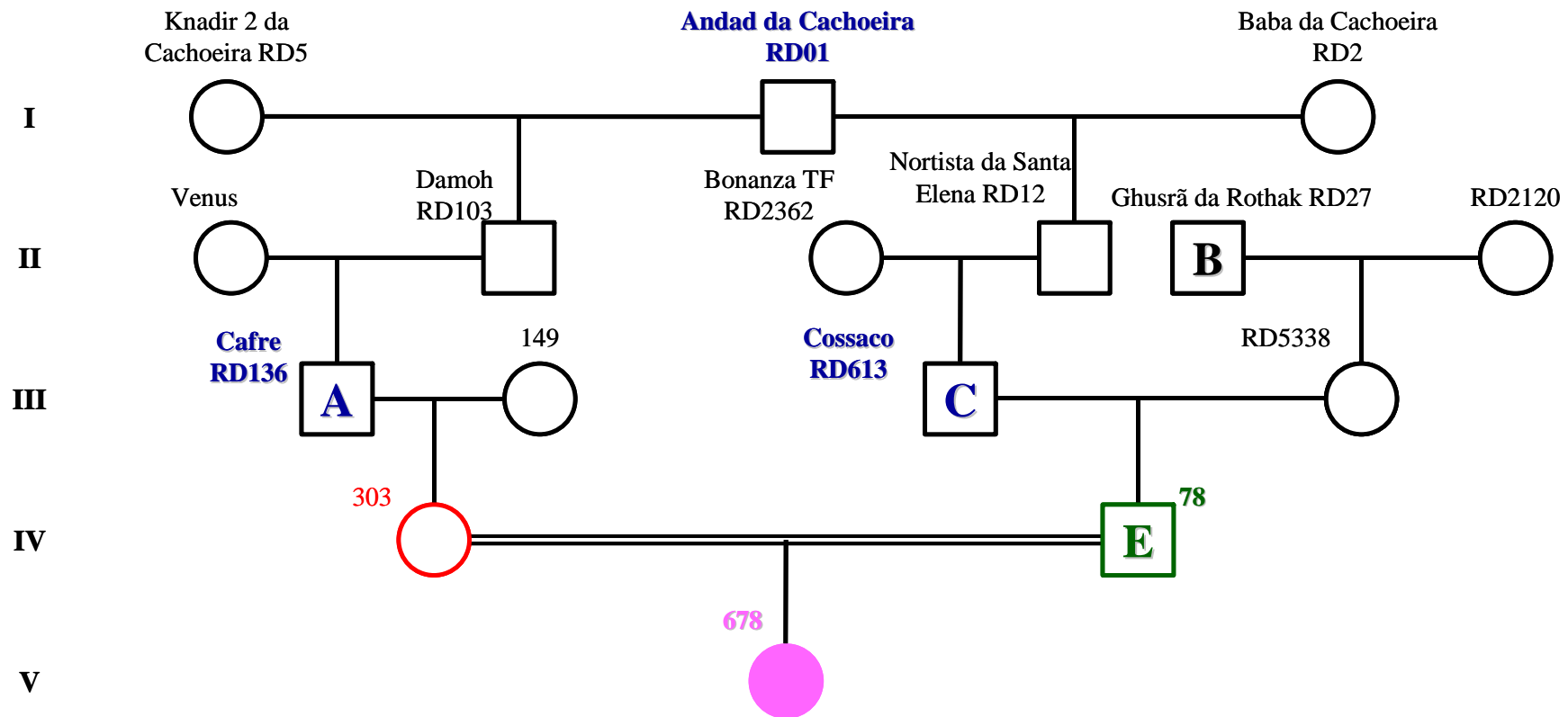


Figura 12 - Heredograma do segundo animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 678. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental e círculo rosa preenchido: fêmea com a Genodermatose. Os nomes grifados em azul indicam touros clinicamente saudáveis, mas portadores do gene que determina a doença.

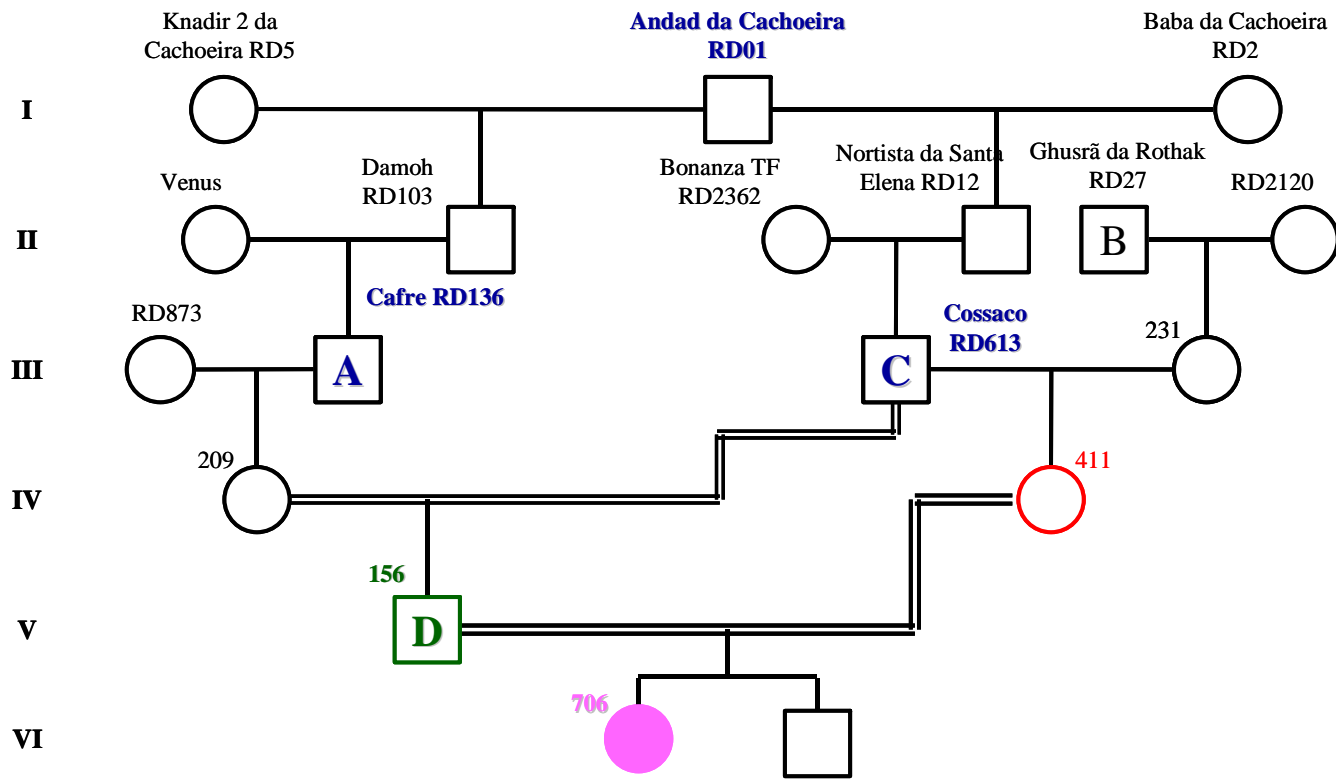


Figura 13 - Heredograma do terceiro animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 706. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental; círculo vermelho: fêmea do rebanho experimental e círculo rosa preenchido: fêmea com a Genodermatose. Os nomes grifados em azul indicam touros heterozigotos para o gene que determinou a doença

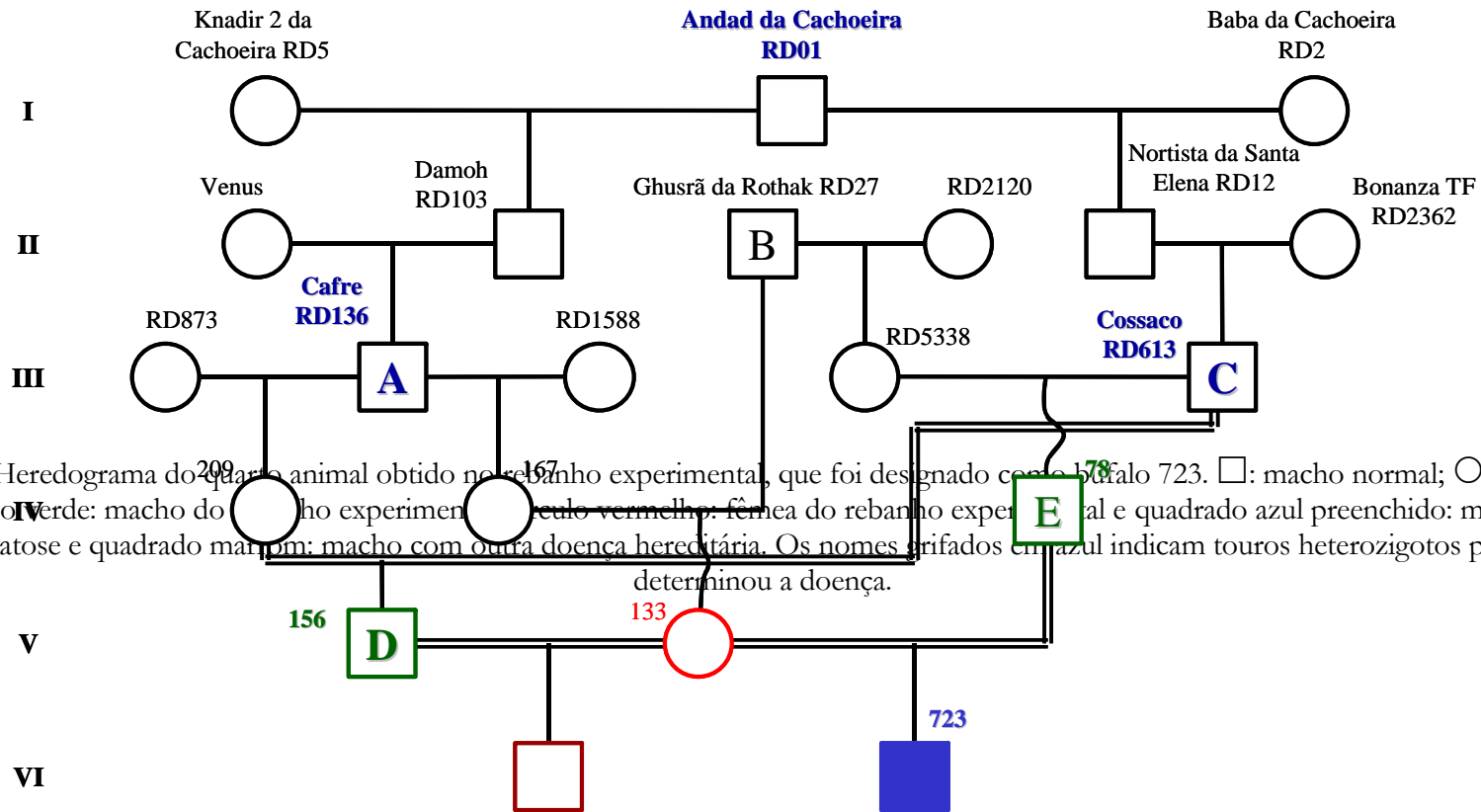


Figura 14 - Heredograma do quarto animal obtido no rebanho experimental, que foi designado como búfalo 723. □: macho normal; ○: fêmea normal; quadrado verde: macho do rebanho experimental de olho vermelho; fêmea do rebanho experimental e quadrado azul preenchido: macho com a Genodermatose e quadrado marrom: macho com outra doença hereditária. Os nomes grifados em azul indicam touros heterozigotos para o gene que determinou a doença.

Estudo da Patogenia da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah

Para estudar a patogenia da doença, foram utilizadas técnicas de imunofluorescência, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os procedimentos preliminares (colheita de material e produção de reagentes) e as técnicas utilizadas são descritos a seguir.

Colheita do Material dos Búfalos Portadores e Controles

As amostras de pele de animais doentes foram colhidas dos 4 animais do rebanho experimental e de 1 búfalo portador da doença identificado numa propriedade de Encruzilhada do Sul, RS.

Na primeira fase, foram realizadas colheitas de cinco amostras de pele por animal. A primeira foi de pele íntegra. A segunda, terceira e quarta amostras foram de pele submetida respectivamente à fricção leve, moderada e intensa com lápis-borracha. A quinta amostra consistiu de pele de lesões em cicatrização. Para colheita utilizou-se *punch* de 0,5cm de diâmetro ou pinça/bisturi, retirando-se amostras elípticas de cerca de 1cm na sua maior largura. Assim sendo, obtiveram-se 5 amostras de pele de cada um dos 5 animais doentes totalizando 25 amostras. As peles foram colhidas imediatamente após a indução da lesão

Posteriormente dois animais doentes do rebanho experimental (búfalas 678 e 706) tiveram que ser sacrificados *in extremis* e foram submetidos à necropsia. Colheram-se então amostras de pele íntegra, submetida à fricção leve, fricção intensa e pele cicatrizada, de cada um dos animais. Totalizaram-se então 33 amostras de pele de animais doentes. Além das peles, colheram-se amostras de fígado, pulmões, rins, coração, baço, linfonodos, gengiva, língua, esôfago, pré-estômagos, abomaso, intestinos, bexiga, útero e cérebro dos dois animais doentes submetidos à necropsia.

Para controle das técnicas a serem utilizadas, foram colhidas 4 amostras de pele (íntegra e peles submetidas à fricção leve, moderada ou intensa) de 2 búfalos sadios de idades semelhantes aos afetados que pertencentes ao rebanho experimental, e de 2 búfalos sadios, pertenciam ao rebanho do Departamento de Produção Animal da FMVZ-UNESP de Botucatu (Fazenda Lageado). Frações de cada uma das amostras de pele foram fixadas em formalina tamponada 10% ou em glutaraldeído 2,5%. Além disso, foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente mantidas em freezer -20°C.

Para controle das técnicas foram colhidos linfonodos mesentéricos e traqueais de 5 búfalos normais, durante abate em indústria frigorífica¹ e pele, esôfago e linfonodos mesentéricos e traqueais de 2 bovinos, durante necropsia para verificação de óbito no Departamento de Patologia da FMVZ-UNESP de Botucatu. Parte das amostras desses órgãos foi fixada em formalina tamponada 10% e parte foi congelada.

As amostras de pele, linfonodos e mucosas de animais controle foram processadas de modo adequado para que fosse realizada a técnica de imuno-histoquímica. Todas as amostras de pele foram submetidas ao processamento para microscopia eletrônica de transmissão e amostras de pele (de doentes e controles) e linfonodos foram destinados à imunofluorescência. As peles e os demais órgãos foram também processados como de rotina para coloração por hematoxilina-eosina.

O total de amostras e seu respectivo processamento é demonstrado no Quadro 5.

¹ Frigorífico Líder, R. Herval do Oeste, 644, Viamão -RS.

Quadro 5 - Amostras colhidas por animal e utilizadas para o estudo da patogenia da Genodermatose dos Búfalos Murrah

Forma de colheita	Técnica	Pele														Total				
		Íntegra				FL		FM		FI		Ci		Linfonodo*			Esôfago		Outro†	
		Bov	Búf	RE	FMVZ	RE	FMVZ	RE	FMVZ	RE	FMVZ	RE	FMVZ	Bov	Búf		Bov	Búf		
Biopsia	H-E	-	07	02	07	02	07	02	07	02	05	-	-	-	-	-	-	-	-	41
	IFD	-	07	02	07	02	07	02	07	02	05	-	-	-	-	-	-	-	-	41
	IHQ	-	07	02	07	02	07	02	07	02	05	-	-	-	-	-	-	-	-	41
	MET	-	07	02	07	02	07	02	07	02	05	-	-	-	-	-	-	-	-	41
Necropsia	H-E	02	02	-	02	-	-	-	02	-	02	02	02	02	02	02	02	02	02	20
	IFD	-	02	-	02	-	-	-	02	-	02	02	02	02	02	02	02	02	02	12
	IHQ	02	02	-	02	-	-	-	02	-	02	02	02	02	02	02	02	02	02	14
	MET	-	02	-	02	-	-	-	02	-	02	02	02	02	02	02	02	02	02	10
Frigorífico	H-E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	05	-	-	05	-	10
	IFD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	05	-	-	05	-	05
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	05	-	-	05	-	10
Total		04	36	08	36	08	28	08	36	08	28	04	17	04	12	08	08	12	08	245

Abreviaturas - Bov: bovino; Búf: búfalo; FMVZ: animais pertencentes ao rebanho do Departamento de Produção Animal da FMVZ-UNESP de Botucatu (Fazenda Lageado); RE: compreendem as amostras dos 4 animais doentes e dos 2 sadios colhidas do rebanho experimental (CPACT-EMBRAPA) e a amostra do búfalo de Encruzilhada do Sul; FL: fricção leve (5 passadas com lápis-borracha); FM: fricção moderada (10 passadas com lápis-borracha); FI: fricção intensa (15 passadas com lápis-borracha); H-E: amostras colhidas e processadas para coloração por hematoxilina-eosina; IFD: amostras colhidas e processadas para imunofluorescência direta; IHQ: amostras colhidas e processadas para imunohistoquímica e MET: amostras colhidas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão.

* Linfonodos traqueais e mesentéricos.

† Fígado, pulmões, rins, coração, baço, linfonodos, gengiva, língua, esôfago, pré-estômago, abomaso, intestinos, bexiga, útero e cérebro.

Imunofluorescência Direta

A imunofluorescência direta (IFD) foi utilizada para avaliar a deposição de frações do complemento e a presença de auto-anticorpos em cortes de congelação das peles de búfalos doentes.

Como controle positivo da técnica foram utilizados linfonodos traqueais e mesentéricos de búfalos normais. Como controles negativos foram utilizadas amostras de pele de animais sadios do rebanho experimental, e do rebanho da Fazenda Lageado. Para pesquisa da presença de frações do complemento foram utilizados conjugados comerciais¹ anti-C1 e C3 humanos, ambos diluídos a 1:10.

Para verificar a deposição de imunoglobulinas nos tecidos foram testados anticorpos comerciais anti IgG, IgM e IgA humanas¹ nas diluições de 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100.

Além desses utilizou-se o conjugado de anti-IgG de búfalo produzida em coelho e diluída a 1:100, após testar-se diluições de 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. A anti-IgG de búfalo foi produzida como parte desse trabalho no Centro de Biotecnologia da UFPel.

Produção do Conjugado Anti-IgG de Búfalo e ITCFO²

Purificação da IgG de Búfalo

Foram utilizados 10ml de sangue de búfalo. Separou-se o soro que foi subdividido em 2 alíquotas e purificado em coluna de proteína A para obtenção da IgG. A partir da primeira alíquota, foram obtidas 7 frações de 2 ml cada.

A partir da segunda alíquota foram obtidas 6 frações de 2ml cada. As frações colhidas corresponderam ao pico de proteína após a adição do tampão citrato-fosfato 0,1M-pH2,2, com vazão de 1,35ml/minuto.

As 4^a, 5^a e 6^a frações da primeira alíquota de soro purificado foram reunidas. Retirou-se então uma amostra destas (30µl) que foi diluída a 1:100 (30µl + 3ml água destilada), para verificação da quantidade de proteína/IgG obtida. Detectaram-se 9,074mg de IgG/ml (Figura 15).

O coeficiente de absorvância da IgG é 1,35, e que o resultado da leitura da espectrofotometria foi de 0,127:

1,35

0,127

x= 0,094074mg

Considerando a diluição da amostra a 1:100: 0,094074 x 100= 9,074

Obteve-se então: 9,074 mg de IgG/ml

² Os procedimentos detalhados para obtenção do conjugado constam do anexo A. ITCFO: Isotiocianato de Fluoresceína

Figura 15 - Cálculo realizado para determinar a quantidade de IgG/ml obtida após a cromatografia.

Da segunda alíquota de soro (1,83ml) que foi purificada recolheu-se da 6^a até a 11^a fração, as quais foram reunidas totalizando 15ml. A leitura da espectrofotometria dessas frações, sem diluição, demonstrou 1,302mg de IgG/ml (Figura 16).

Figura 16 - Cálculo realizado para determinar a quantidade de IgG/ml obtida após a cromatografia.

Definiu-se então que a segunda alíquota de IgG purificada seria a utilizada. Determinou-se que 1mg de IgG correspondiam a 0,8ml de soro purificado (Figura 17).

Figura 17 - Determinação do volume correspondente a 1mg de IgG.

Ou seja:

1,302
1mg

$x = 0,768$ (0,8) ml contém 1 mg de IgG

Produção de Anti-IgG de Búfalo em Coelhos

A IgG foi administrada a 3 coelhos. Realizaram-se 3 aplicações. Na primeira aplicação utilizou-se solução 1:1 de IgG: adjuvante completo de Freund (3ml de IgG com 3ml de adjuvante completo de Freund). Essa solução foi administrada via subcutânea na região dorsal do pescoço de 3 coelhos. Dois deles receberam 1,6 ml e 1 coelho recebeu 1ml da solução.

A segunda aplicação foi realizada 15 dias após a primeira. Foi administrada uma solução 1:1 de IgG: Adjuvante incompleto de Freund (3ml de IgG com 3ml de adjuvante incompleto de Freund). Os 3 coelhos receberam 1,4 ml da solução via subcutânea no dorso do pescoço

A terceira aplicação foi feita no 7^o dia após a segunda, com uma solução 1:1 de IgG:

Considerando coeficiente de absorbância da IgG (1,35), e o resultado da leitura da espectrofotometria de 1,759:

1,35
1,759

$x = 1,302$ mg/ml de IgG/ml

Adjuvante incompleto de Freund (4ml de IgG com 4ml de adjuvante incompleto de Freund). Cada coelho recebeu 2ml da solução no dorso do pescoço. Os coelhos foram

sacrificados por exanguinação 15 dias após a última aplicação para colheita do soro (Quadro 6).

Quadro 6 - Volume de sangue e soro correspondente, obtidos de cada um dos coelhos sacrificados.

Coelho	Total de sangue (ml)	Total de soro (ml)	Total de soro centrifugado (ml)
1	50	26	11*
2	100	20	11,5*
3	125	41	15,5#

* sangue centrifugado a 3000rpm por 5 min

sangue centrifugado a 3000rpm por 8 min

O soro do coelho 3 foi purificado por cromatografia em coluna de proteína A, para obtenção da IgG de coelho anti-IgG de búfalo. O soro foi dividido em alíquotas e 3 delas foram purificadas (Quadro 7).

Quadro 7 - Produtos obtidos da purificação do soro do coelho 3 por cromatografia em coluna de proteína A.

Alíquota	Quantidade purificada	Nº de frações obtidas	Volume obtido
1ª	3 ml	4 frações (4 a 7)	8ml
2ª	3 ml	3 frações (18 a 20)	6ml
3ª	3 ml	4 frações (34 a 37)	8ml

As frações resultantes foram reunidas e submetidas à precipitação com Sulfato de Amônio. A quantidade de IgG foi verificada por espectrofotometria, resultando 13,33 mg de IgG/ml (Figura 18).

Figura 18 - Cálculo realizado para determinar a quantidade de IgG/ml obtida após a

Considerando coeficiente de absorvância da IgG de 1,35, e o resultado da leitura da espectrofotometria de 0,180:

$$1,35$$

$$0,180$$

$$x = 0,1333 \text{ mg/ml}$$

Considerando a diluição da amostra a 1:100:

$$0,1333 \times 100 = 13,33$$

Obteve-se então: 13,33mg de IgG/ml

precipitação com sulfato de amônio.

Teste da Anti-IgG de Búfalo Produzida em Coelho

Para verificar a eficiência dessa anti-IgG de búfalo purificada do soro do coelho, ela foi testada através de gel-difusão em ágar, utilizando-se a IgG de búfalo como antígeno. Como resultado, verificou-se uma linha de precipitado evidente frente à anti-IgG pura e diluída a 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. A placa foi avaliada após 24 e 48h de incubação.

Produção do Conjugado de Anti-IgG com ITCFO

A anti-IgG de búfalo, foi então conjugada com ITCFO através de diálise. O excesso de fluoresceína foi retirado por cromatografia em coluna de Sephadex.

Teste de Imunofluorescência Direta¹

Os cortes obtidos em criostato foram então fixados em acetona e incubados em câmara úmida escura por 30 minutos com os diferentes conjugados nas diluições especificadas no item 2.2. As lâminas foram contrastadas com Azul de Evans e montadas com lamínula.

Procedeu-se então a análise dos cortes e a documentação fotográfica dos resultados obtidos nas amostras analisadas em microscópio de fluorescência.

Imuno-Histoquímica¹

Através da imuno-histoquímica buscou-se pesquisar a presença de auto-anticorpos e o padrão de expressão de duas moléculas de adesão que compõem o desmossomo em peles dos búfalos portadores da Genodermatose Mecanobolhosa e nos tecidos e órgãos utilizados como seus respectivos controles.

Pesquisa de Auto-anticorpos com Anticorpos Anti-imunoglobulinas de Bovinos

Para pesquisa de auto-anticorpos, anti-IgG₁, anti-IgG₂, anti-IgM e anti-IgA bovinas comerciais², produzidas em coelho, foram utilizadas como anticorpos primários.

A reatividade cruzada entre as espécies foi verificada através da técnica de ELISA-indireto. Para tal, placas foram revestidas com imunoglobulinas de búfalo, e a essas foi adicionada cada uma das imunoglobulinas a serem testadas. Posteriormente agregou-se fosfatase alcalina anti-IgG de coelho ou uma Anti-IgG bovina, que podia ser biotinizada ou ainda diretamente marcada com fosfatase alcalina ou peroxidase. Os testes foram realizados também com as proteínas A e G. Com exceção da proteína A para qual o teste foi negativo, todos os outros anticorpos reagiram de forma adequada. Como controles de marcação positiva, foram utilizados linfonodos mesentéricos e traqueais de búfalos, obtidos durante o abate de animais em indústria frigorífica. Empregaram-se também linfonodos mesentéricos e traqueais de bovino. Foram utilizados cortes de parafina e congelação.

Foram testadas diluições de 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 das anti-imunoglobulinas em questão. Realizou-se a inativação da peroxidase endógena

¹ Os procedimentos detalhados para realização da técnica constam no anexo B.

² Anticorpos monoclonais anti-bovino, produzidos em coelho e procedentes da DAKO Diagnostics, AG. Esses anticorpos foram doados pela Dra. Maja Suter, do Instituto de Patologia Veterinária da Universidade de Berna, Suíça.

com solução de metanol-H₂O₂3% para cortes de congelação ou H₂O₂3% para cortes de parafina. Testou-se a recuperação antigênica nos cortes de parafina pelos métodos do forno de microondas, panela de pressão e tripsina.

Em todos os testes empregou-se anticorpo biotínido antiovelho como anticorpo secundário. Posteriormente, os cortes foram incubados com um complexo enzimático de avidina-biotina¹. O cromógeno usado foi o 3,3'-tetra-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB). Os cortes foram então contra-corados com Hematoxilina e montados como de rotina.

Avaliação da Distribuição das Proteínas Desmossômicas

Para averiguar o padrão de expressão da desmoplaquina (molécula de adesão da placa desmossômica) foi utilizado um anticorpo monoclonal antidesmoplaquinas I e II².

Para estudar a expressão da desmogleína (caderina desmossômica) empregou-se um anticorpo monoclonal anti-desmogleína³. Os testes foram realizados em cortes de parafina e congelação.

Para padronização da técnica e como controles foram utilizados: 1) pele de búfalos normais, 2) pele de bovinos normais, 3) esôfago de búfalos normais e 4) esôfago de bovinos normais. De todos esses materiais foram realizados cortes de congelação e parafina.

Foram testadas diluições do anticorpo primário anti-desmoplaquina I e I de 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100. Para o anticorpo primário anti-desmogleína foram testadas diluições que variaram de 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.

A inativação da peroxidase endógena e a recuperação antigênica foram realizadas de modo idêntico ao descrito na seção 2.3.1. Em todos os testes empregou-se como anticorpo secundário o anticorpo biotínido anticamundongo e o procedimento seguinte foi o mesmo da pesquisa de auto-anticorpos por imuno-histoquímica.

Microscopia Eletrônica de Transmissão⁴

Foram colhidos fragmentos de pele de 1mm de espessura, fixados por imersão em glutaraldeído 2,5% (tampão cacodilato de sódio-0,1M/pH7,3) e incluídos em resina. As amostras foram, então, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,2M/pH7,4.

Os fragmentos foram desidratados por passagens em séries crescentes de álcool etílico (50°, 75°, 95° e álcool absoluto) ou acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e posteriormente impregnadas e incluídas em resina epóxi 812 ou Araldite.

Cortes semifinos (1µm) foram obtidos em ultramicrótomo Reichert-Jung/Supernova, corados com azul de metileno/azur II, e observados à microscopia óptica, para seleção das áreas para os cortes ultrafinos.

Os cortes ultrafinos (70nm) foram contrastados com acetato de uranila (CO₂ sensível) e citrato de chumbo a 0,2%.

¹ VECTASTAIN® Elite ABC Kit (Standard), nº de catálogo PK-6100

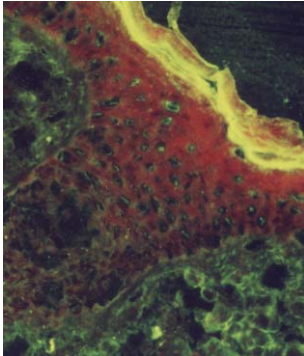
² Especificações no Anexo C: Bidesign International, nº de catálogo H54173M.

³ Especificações no Anexo C: Bidesign International, nº de catálogo H54174M.

⁴ Os procedimentos detalhados para realização da técnica constam no anexo B.

A avaliação dos espécimes e as fotomicrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss LEO900, operado a 60kV.

Resultados



RESULTADOS

Achados no Rebanho Experimental de Búfalos Murrah

De um modo geral, os animais apresentaram fragilidade excessiva da pele mesmo quando trauma mínimo como a fricção do lápis-borracha foi aplicada. Cerca de 5 passadas leves com o lápis-borracha eram suficientes para determinar o desprendimento da pele deixando escarificações evidentes. Lesões extensas também foram induzidas acidentalmente durante atividades de manejo convencional, como o ato de laçar os animais, colocá-los no brete ou ainda simplesmente quando eles se roçavam nas cercas (Figuras 19A e 19B).

Deformidades nos estojos córneos dos cascos e dos chifres também foram observadas com frequência (Figuras 19A e 19C). Por vezes os estojos córneos eram perdidos (Figura 19C) como consequência de traumatismos triviais.

Na histologia observou-se que havia o desprendimento suprabasal da epiderme (Figura 20A), mesmo nas amostras submetidas à fricção leve. O teto da fenda era constituído pelas camadas suprabasais de queratinócitos, que continham células íntegras. No interior da fenda, por vezes foram encontradas células acantolíticas e no assoalho observaram-se os queratinócitos basais ainda aderidos à derme.

A formação de pequenas fendas, especialmente nas extremidades do corte pôde ser observada nas amostras de pele íntegra, colhidas com *punch* de 0,5cm. Pôde-se evitar esse efeito indesejado quando a colheita foi feita com bisturi. Observou-se então a pele íntegra, sem qualquer sinal de espongiose, acantólise ou clivagem (Figura 20B).

Nas amostras correspondentes à pele íntegra ou nas lesões induzidas, não se observou qualquer infiltrado inflamatório seja na derme, JDE ou epiderme. A derme apresentou-se íntegra e sem qualquer indício de alteração morfológica mesmo nas lesões induzidas por fricção intensa.



Figura 19 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (19A) Lesões no pescoço induzidas pelo atrito da corda no momento de laçar o animal. Demais lesões nas orelhas e face também foram induzidas por traumatismos ocasionais. Notam-se ainda lesões cicatrizadas na face e deformidades do estojo córneo do chifre. (19B) Detalhe da lesão induzida por traumatismo trivial moderado. (19C) Observa-se a deformidade do estojo córneo dos cascos, além da perda de um dos casquinhos no momento em que se manjava o búfalo.

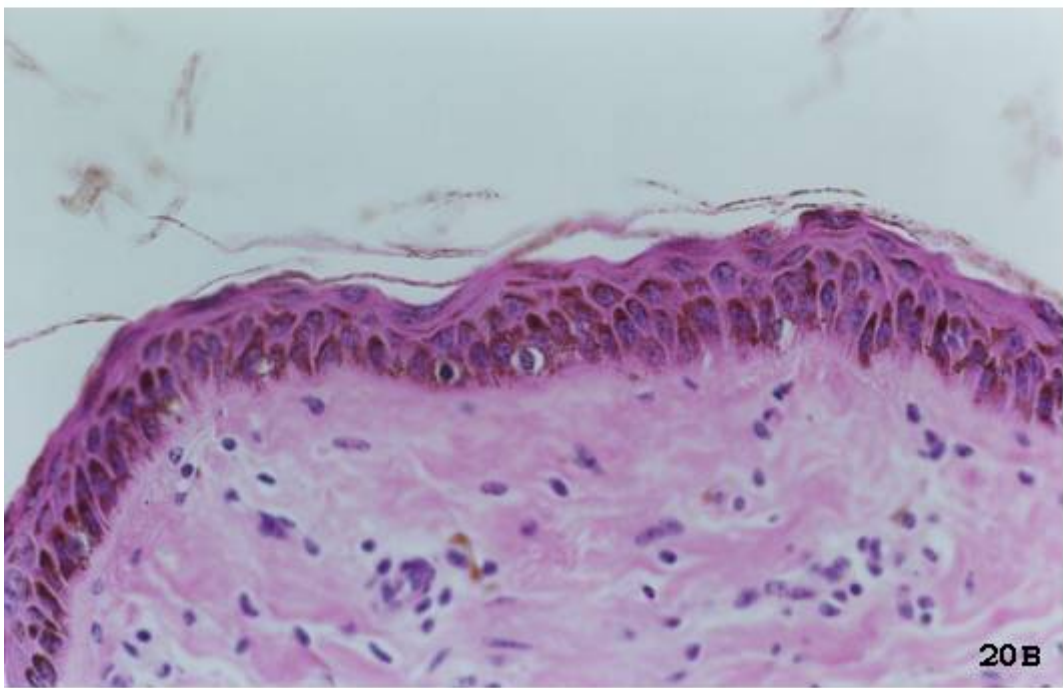
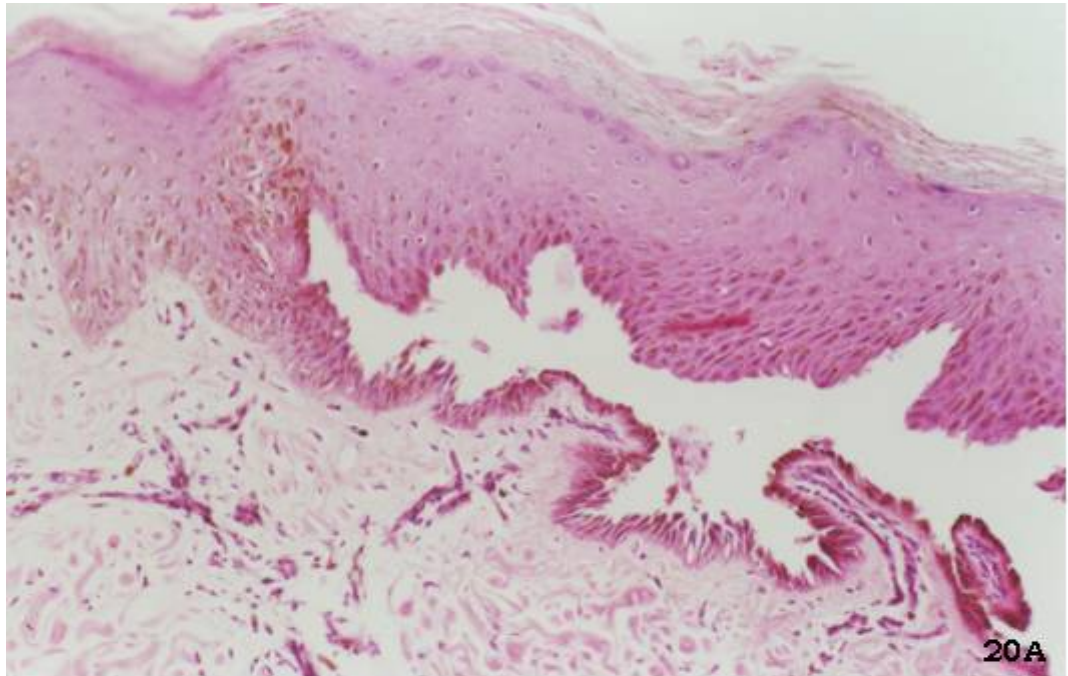


Figura 20 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (20A) Pele submetida à fricção leve. Observa-se a lesão típica da doença, caracterizada pelo desprendimento suprabasal da epiderme. Algumas células acantolíticas também podem

ser observadas no interior da fenda. (20B) Pele íntegra de um búfalo doente. Não há qualquer sinal de lesão.

As peles lesadas cicatrizaram normalmente, sem que houvesse formação de cicatriz hipertrófica, quelóides ou qualquer outra complicação (Figura 21A). Na histologia, observou-se que a epiderme aparecia íntegra e totalmente regenerada (Figura 21B). Em locais submetidos a lesões sucessivas, observou-se o alongamento das cristas epidérmicas e desorganização da derme papilar. Ela estava espessada e o colágeno era mais denso que o típico dessa região. Por vezes havia ainda discreto infiltrado linfocitário (Figura 21C).

Os animais doentes, tanto do rebanho experimental ou de Encruzilhada do Sul, tinham pais e mães sadios os quais apresentavam pele e mucosas normais (Figura 22A).

A fragilidade da pele foi verificada desde os primeiros dias de vida. À medida que os búfalos doentes cresceram, foram se tornando quase alopecicos e acinzentados, apresentavam numerosas cicatrizes (Figuras 22B e 22C) e mantiveram sempre o mesmo padrão de fragilidade da pele. Eles tiveram seu desenvolvimento comprometido e não demonstravam o mesmo de ganho de peso do restante do rebanho. Além disso, eles sofreram com mais intensidade o rigor do inverno e eram segregados pelos animais normais.

Após o inverno de 2000, as búfalas 678 e 706 ficaram muito debilitadas e não recuperaram sua condição corpórea. A 678 foi sacrificada *in extremis* em outubro de 2000 e a 706 em dezembro de 2000. Foram realizadas necropsias desses animais, e observou que as lesões ficavam restritas à pele. Demais órgãos possuíam forma, tamanho, peso e localização normais. Atenção especial foi dada às mucosas que estavam íntegras e não apresentavam qualquer indício de fragilidade do epitélio ou cicatrizes (Figuras 23A e 23B).

Na histologia da pele observaram-se as mesmas lesões já descritas. Observou-se ainda que os demais órgãos (fígado, pulmões, rins, coração, baço, linfonodos, gengiva, língua, esôfago, pré-estômagos, abomaso, intestinos, bexiga, útero e cérebro) não apresentavam quaisquer alterações. O epitélio das mucosas também era normal (23C).

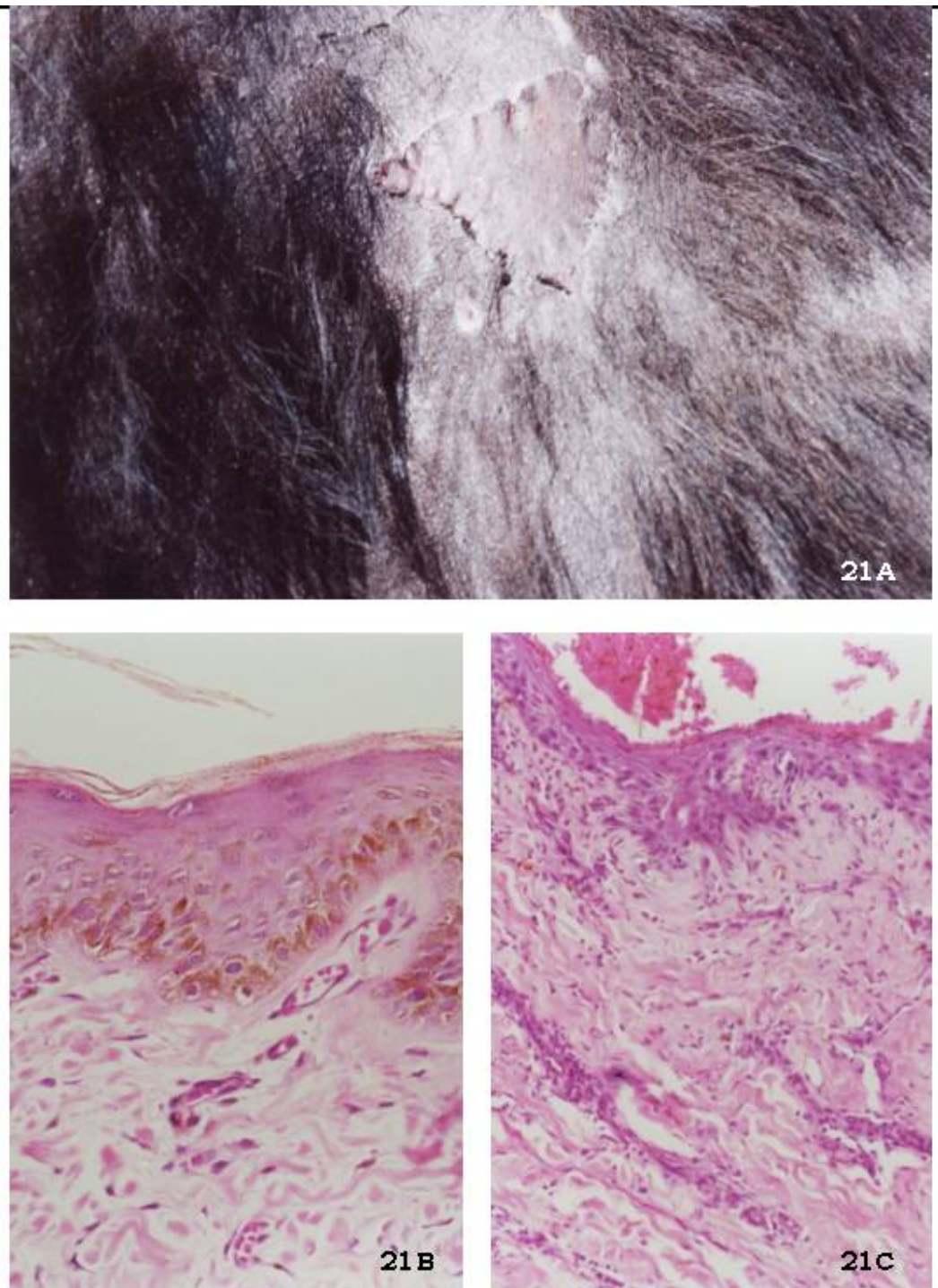


Figura 21 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (21A) Lesão cicatrizada. (21B) Aspecto histológico de uma lesão cicatrizada. (21C) Aspecto histológico de uma área submetida a várias lesões subsequentes.



Figura 22 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. (22A) Búfalo 655, com 5 meses de idade juntamente com sua mãe (vaca 406) sadia. (22B) Búfalo 655 com 1 ano, 678 com 5 meses e 706 com 4 meses de idade. (22C) Búfalo 678 com 2 anos e 8 meses e 706 com 2 anos e 7 meses de idade.



Figura 23 - Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. Búfalo 706. (23A) Gengiva e (23B) esôfago de animal doente, demonstrando que mesmo após fricção intensa não houve lesão do epitélio das mucosas. (23C) Aspecto histológico normal do epitélio da mucosa do esôfago desse mesmo animal.

Estudo da Patogenia da dermatose hereditária dos búfalos

Testes de Imunofluorescência Direta

Teste de Imunofluorescência Direta para Pesquisa das Frações C1 e C3 do Complemento

Para verificar a deposição de frações do complemento em peles de búfalos portadores da Genodermatose Mecanobolhosa, o conjugado comercial anti-C1 e C3 humano foi testado em linfonodos de búfalos e bovinos (controle positivo), pele de búfalos sadios (controle negativo) e finalmente nas peles dos animais doentes.

Os linfonodos mesentéricos e traqueais de búfalos e bovinos testados demonstraram marcação positiva para as frações C1 (Figura 24A) e C3 do complemento, quando se utilizou conjugado comercial anti C1 e C3 humano. A imunofluorescência era mais evidente nas áreas periféricas aos centros germinativos dos folículos linfóides e nas regiões perivasculares. Autofluorescência inespecífica foi observada no tecido conjuntivo vascular.

Ao testar as peles de búfalos sadios provenientes do mesmo rebanho dos animais doentes e de animais de outro rebanho, observou-se que não houve marcação para as frações C1 (Figura 24B) e C3 do complemento, utilizando-se o mesmo conjugado testado nos linfonodos. Detectou-se apenas marcação inespecífica relacionada com a fluorescência da queratina da epiderme e do colágeno da derme. Na pele de animais portadores da Genodermatose Mecanobolhosa também não houve fluorescência positiva para as frações C1 e C3 do complemento, seja nas áreas de pele íntegra (Figura 24C) ou lesada (Figura 24D). Também se verificou marcação inespecífica devido à autofluorescência da queratina da epiderme e do colágeno da derme.

Testou-se apenas o conjugado diluído à 1:10. Essa diluição, além de ser a recomendada utilizada na rotina do laboratório, mostrou-se eficiente na marcação dos linfonodos mesentéricos e traqueais utilizados como controles positivos da técnica.

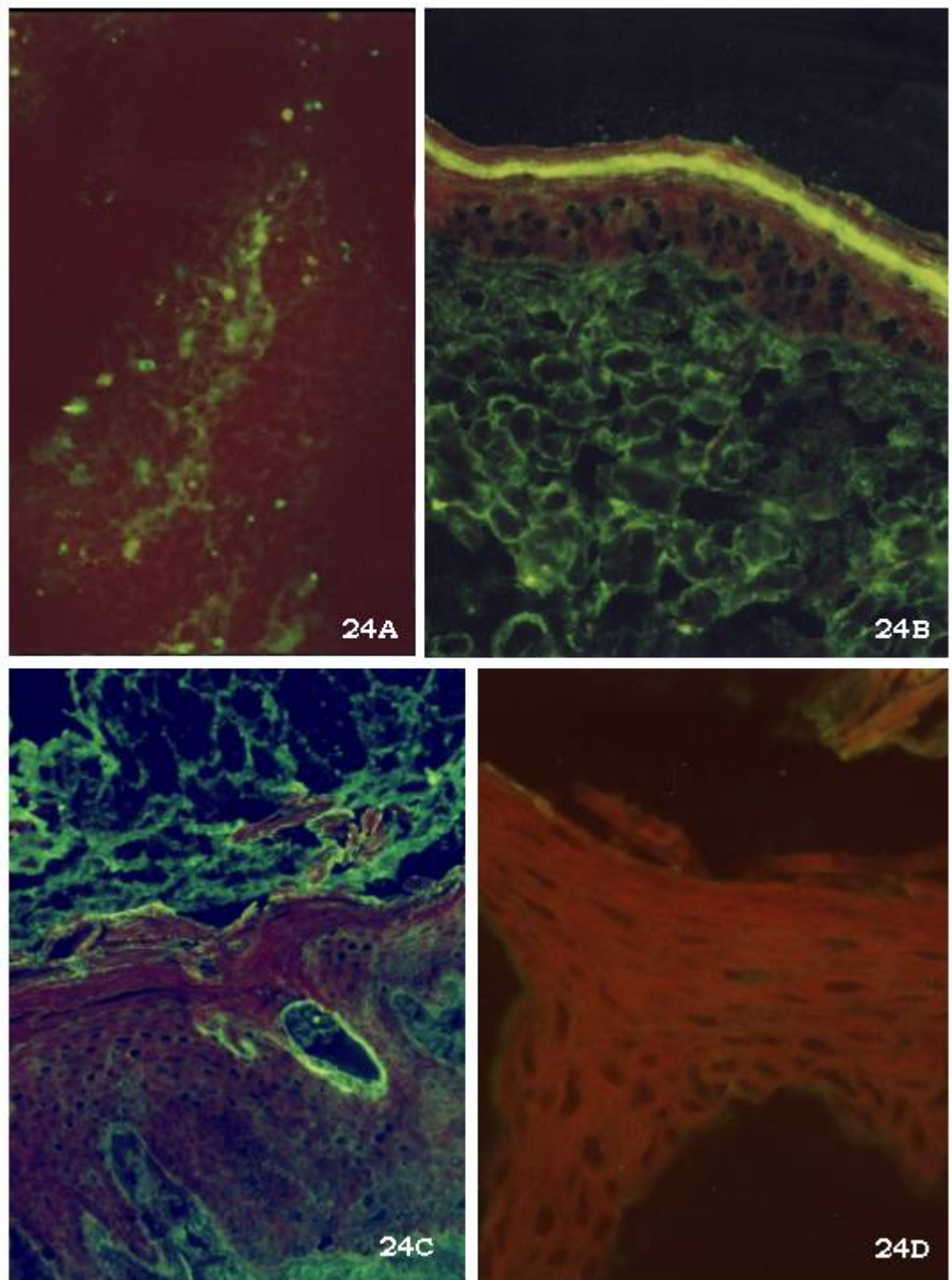


Figura 24 - Imunofluorescência direta para pesquisa de fração C1 do complemento na Genodermatose Mecanobolhosa. (24A) Marcação positiva em linfonodo mesentérico de búfalo (controle positivo). (24B) Pele de búfalo sadio (controle negativo), (24C) pele íntegra e (24D) pele lesada de doente demonstrando que não há marcação para fração C1 do complemento.

Teste de Imunofluorescência Direta para Pesquisa de Auto-anticorpos

Pesquisa de Auto-anticorpos com Conjugados Comerciais

Não foi possível obter marcação fluorescente positiva nos linfonodos mesentéricos e traqueais de bovinos e búfalos, que foram utilizados como controles positivos da marcação, quando se empregaram anti-imunoglobulinas totais, anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humanos. Assim sendo, elas não foram utilizadas para pesquisa de auto-anticorpos nas peles de búfalos.

Pesquisa de Auto-anticorpos com Anti-IgG de Búfalo

O conjugado anti-IgG de búfalo foi utilizado para verificar a deposição IgG em peles de búfalos portadores da Genodermatose Mecanobolhosa. O conjugado foi testado em linfonodos de búfalos e bovinos (controle positivo), pele de búfalos sadios (controle negativo) e finalmente nas peles dos animais doentes.

Houve marcação positiva com a anti-IgG de búfalo nos linfonodos mesentéricos e traqueais de bovinos e búfalos (Figura 25A). Os melhores resultados foram obtidos com a diluição do conjugado a 1:100.

O mesmo anticorpo, também na diluição de 1:100 foi testado em peles de búfalos normais e nas peles dos búfalos acometidos pela doença. Tanto nas amostras de pele animais normais (Figura 25B) como nas amostras de pele íntegra (Figura 25C) ou com lesão de animais acometidos pela Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah (Figura 25D) não houve marcação positiva para IgG.

Outras diluições, como 1:50 e 1:200 também se demonstraram eficientes. No entanto, na primeira houve muita marcação inespecífica e de fundo. Na diluição de 1:200, a imunofluorescência, embora não comprometesse o resultado, foi mais fraca. Optou-se, então, pela diluição de 1:100 como padrão para a realização dos testes.

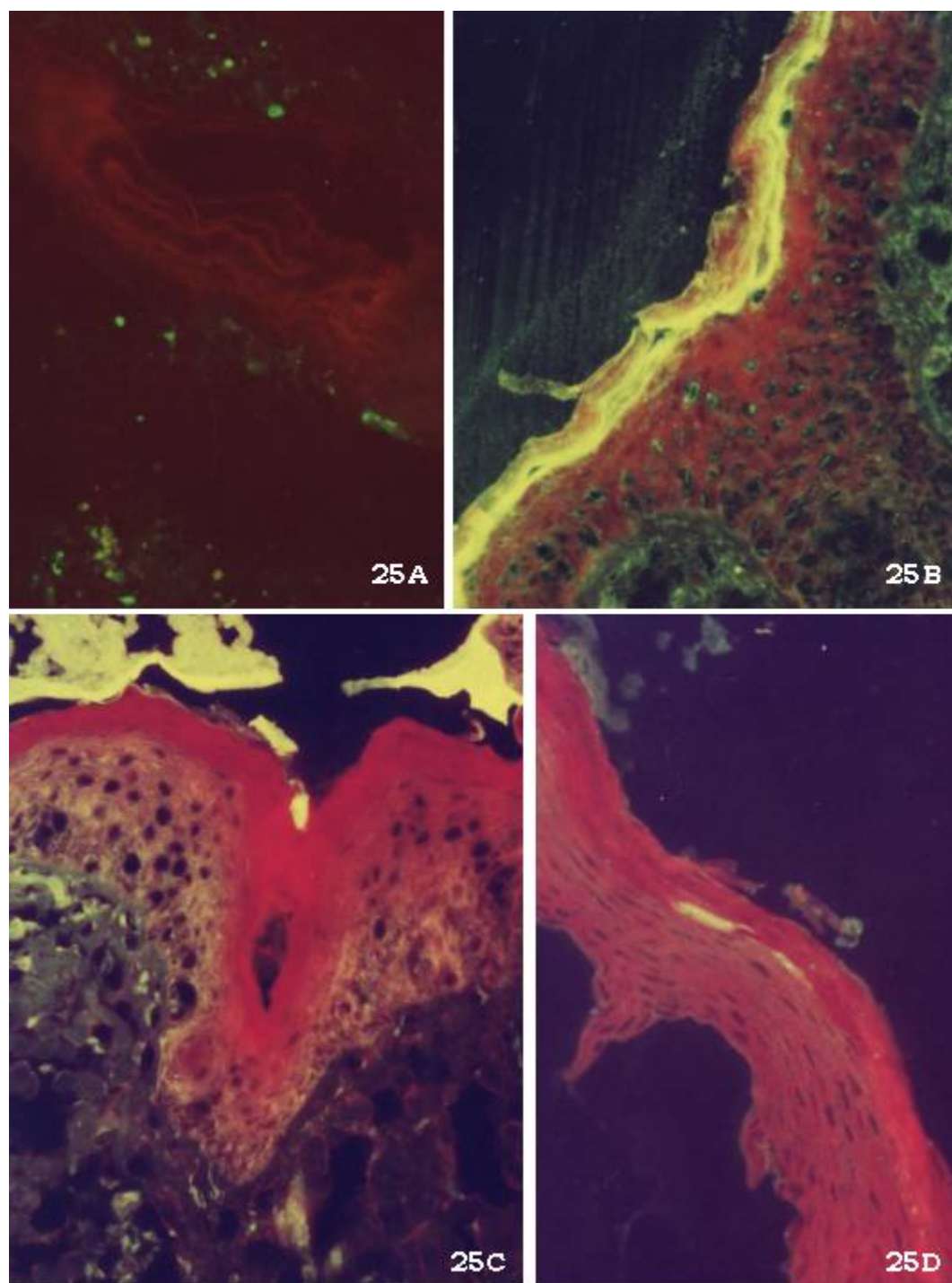


Figura 25 - Pesquisa da deposição de auto-anticorpos na Genodermatose Mecanobolhosa. (25A) Linfonodo mesentérico de búfalo, exibindo marcação positiva para IgG de búfalo (controle positivo). (25B) Pele de búfalo normal (controle negativo). (25C) Pele íntegra de búfalo doente e (25D) pele de búfalo doente com lesão. Nas peles testadas com conjugado anti-IgG de búfalo observou-se somente marcação inespecífica.

Pesquisa de Auto-anticorpos com Anticorpos Comerciais Anti-Imunoglobulinas de Bovinos

As anti-imunoglobulinas de bovinos não foram eficientes na detecção de anticorpos IgG, IgM ou IgA livres no tecido ou em plasmócitos, em cortes de congelação ou parafina, nos linfonodos mesentéricos e traqueais de búfalos e de bovinos, que serviram como controle positivo da técnica. O único padrão de marcação detectado foi encontrado no citoplasma de escassas células com morfologia compatível com a de plasmócitos. Já que a imunomarcação dos controles não foi confiável, mesmo após se tentar numerosas variações na técnica, decidiu-se que as peles de búfalos portadores Genodermatose Mecanobolhosa não seriam testadas frente a esses anticorpos.

Avaliação da Distribuição das Proteínas Desmossômicas

DESMOPLAQUINA

Na fase de padronização da técnica de imuno-histoquímica para desmoplaquina, obteve-se marcação francamente positiva nos queratinócitos da mucosa do esôfago de bovinos e búfalos normais em cortes de parafina (Figura 26A) e congelação (Figura 26B). A imunomarcação positiva foi também observada nas peles de bovinos e búfalos normais (Figura 26C) e ocorreu tipicamente na periferia das células, acompanhando a circunferência da membrana plasmática.

Detectou-se imunomarcação tanto em cortes de parafina como em cortes de congelação. Em cortes de parafina foi necessário utilizar a diluição do anticorpo primário a 1:5 e, mesmo assim, a marcação era fraca. Em cortes de congelação, obteve-se marcação adequada com o anticorpo primário diluído a 1:20. Nesse caso, foi necessário fazer a inativação da peroxidase endógena com a solução de metanol-H₂O₂3%, ao invés do H₂O₂3%, para que o tecido fosse preservado e os núcleos se mantivessem intactos.

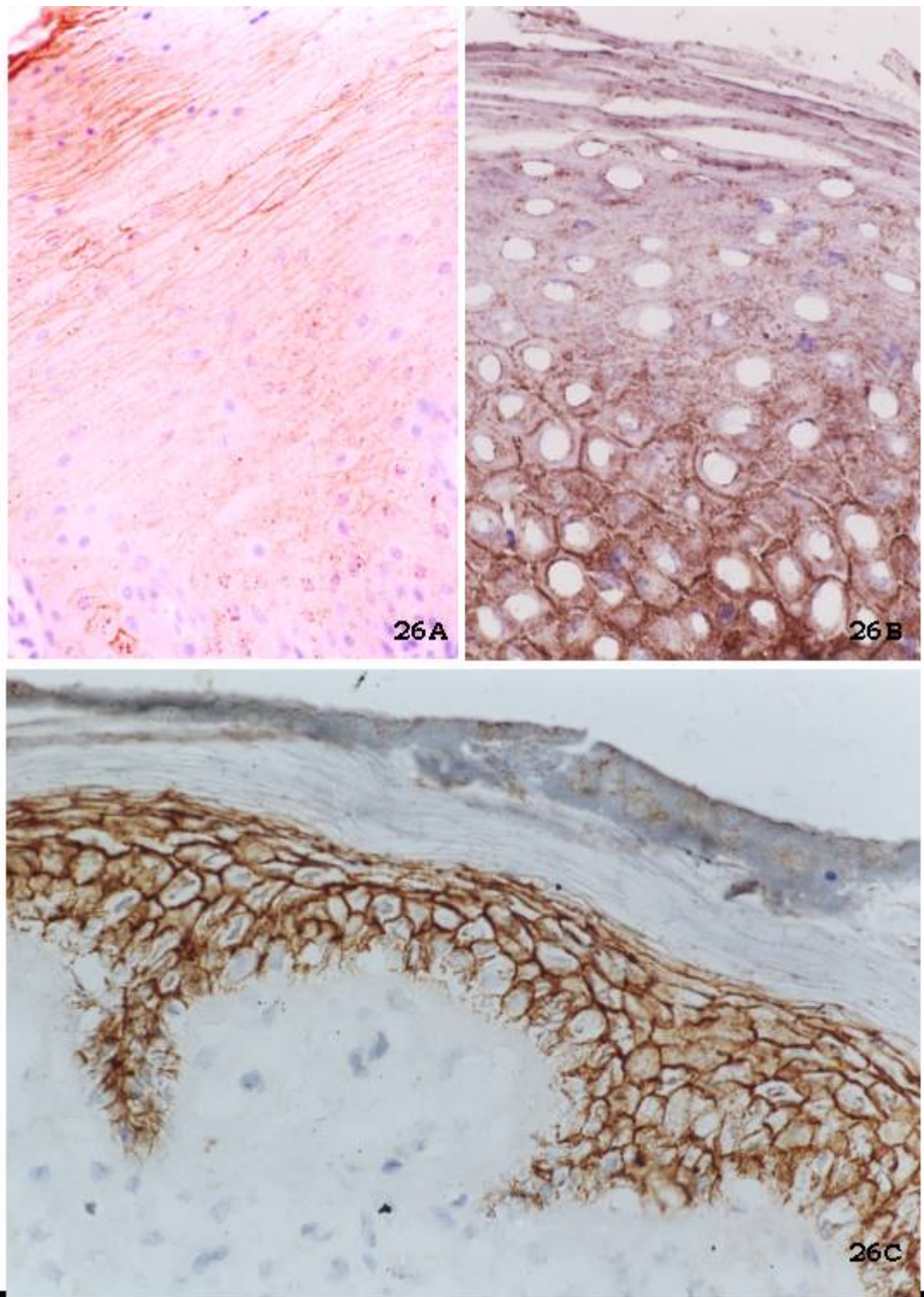


Figura 26 - Estudo da distribuição das desmoplaquinas I/II na Genodermatose Mecanobolhosa. (26A) Esôfago de bovino em corte de parafina (diluição de 1:5). (26B) Esôfago de búfalo sadio em corte de congelação (diluição de 1:10) (26C) Pele de búfalo

sadio em corte de congelação (diluição de 1:20). Todas essas amostras apresentaram imunomarcação positiva.

Assim sendo, a presença e distribuição das desmoplaquinas I e II nas peles de búfalos controles e doentes foi avaliada em cortes de congelação com o anticorpo primário diluído a 1:20.

Tanto nas peles de animais sadios (controles), como nas áreas perilesão íntegras em búfalos portadores da Genodermatose Mecanobolhosa (Figura 27A), observou-se marcação da membrana dos queratinócitos. Constatou-se, ainda, que os queratinócitos basais não apresentaram marcação na sua superfície basal, que compõe a JDE, embora as faces laterais e apicais se apresentassem marcadas, mesmo nas áreas adjacentes à fenda (Figura 27B). Os queratinócitos que compunham as bainhas dos folículos pilosos apresentaram o mesmo padrão de marcação dos queratinócitos da epiderme, tanto nos controles como nos animais doentes (Figura 27C). Nas glândulas sebáceas verificou-se que somente as células basalóides de reserva apresentavam imunomarcação. À medida que elas se diferenciavam em células com conteúdo lipídico perdiam essa característica. Esse fato foi comum aos animais doentes e controle (Figura 27D).

Nas áreas de lesão, pôde-se observar o mesmo padrão de marcação nos queratinócitos suprabasais que compunham o teto e o assoalho da fenda (Figuras 28A e 28B). Por vezes, houve uma marcação mais intensa dos queratinócitos das bordas do assoalho e do teto da fenda. Acredita-se que essa seja uma variação artefactual no padrão de marcação. As peles submetidas à fricção moderada a intensa apresentaram grande quantidade de células acantolíticas no interior da fenda. Essas células acantolíticas perderam completamente a marcação definida da membrana celular e assumiram uma leve coloração difusa no citoplasma (Figura 28C).

O epitélio regenerado na lesão cicatricial apresentou as mesmas características de imunomarcação de um epitélio íntegro, de animal doente ou sadio (Figura 28D), não podendo ser diferenciado dos mesmos.

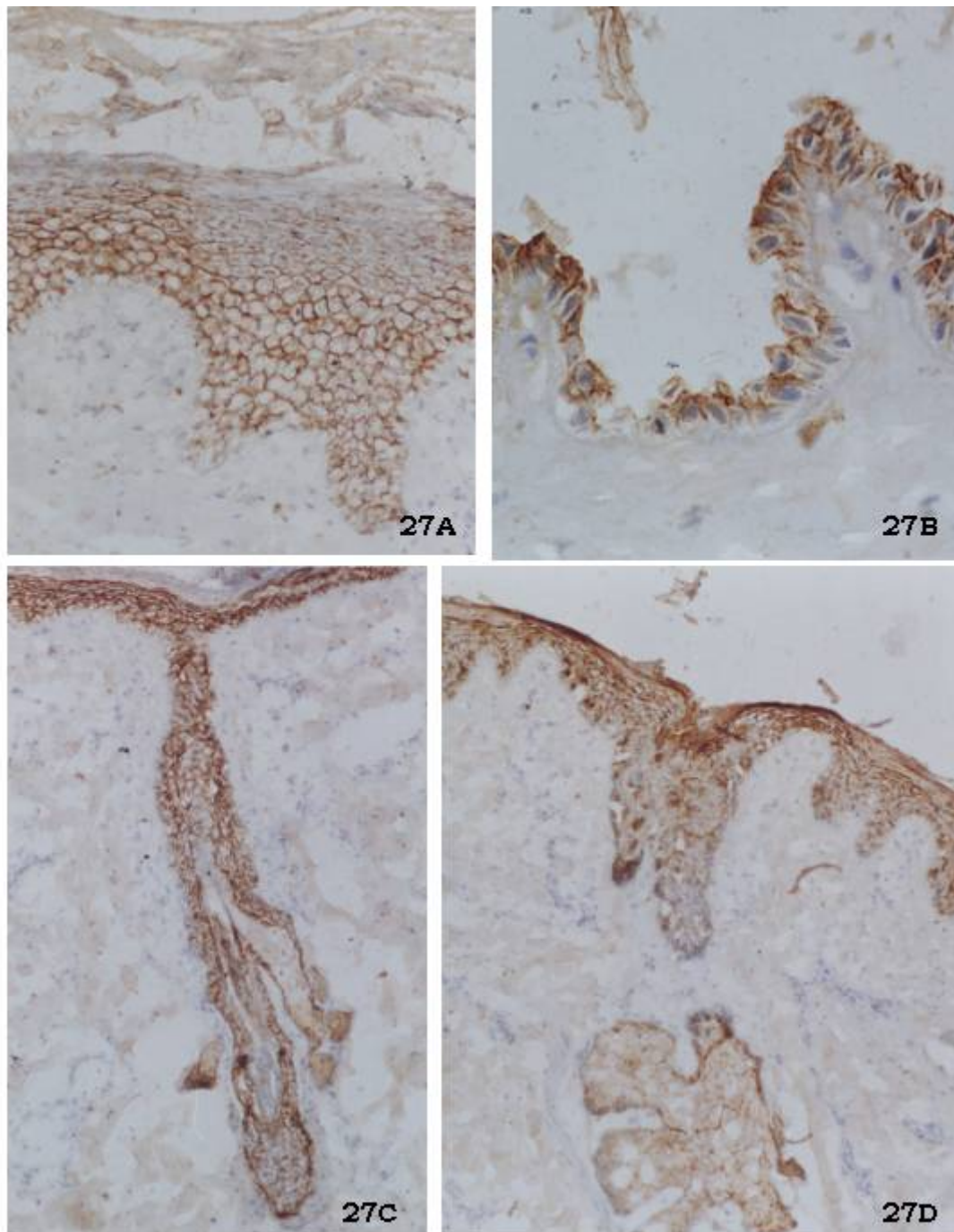


Figura 27 - Distribuição das desmoplaquinias I/II na Genodermatose dos Búfalos Murrah. (27A) Área perilesão de animal doente com marcação normal. (27B) Área de lesão, onde observa-se que não há marcação na face basal dos queratinócitos basais. (27C) Padrão de imunomarcacão de anexos: queratinócitos da bainha do folículo piloso exibindo a marcação típica. (27D) Glândula sebácea apresentando marcação somente das células basalóides de reserva.

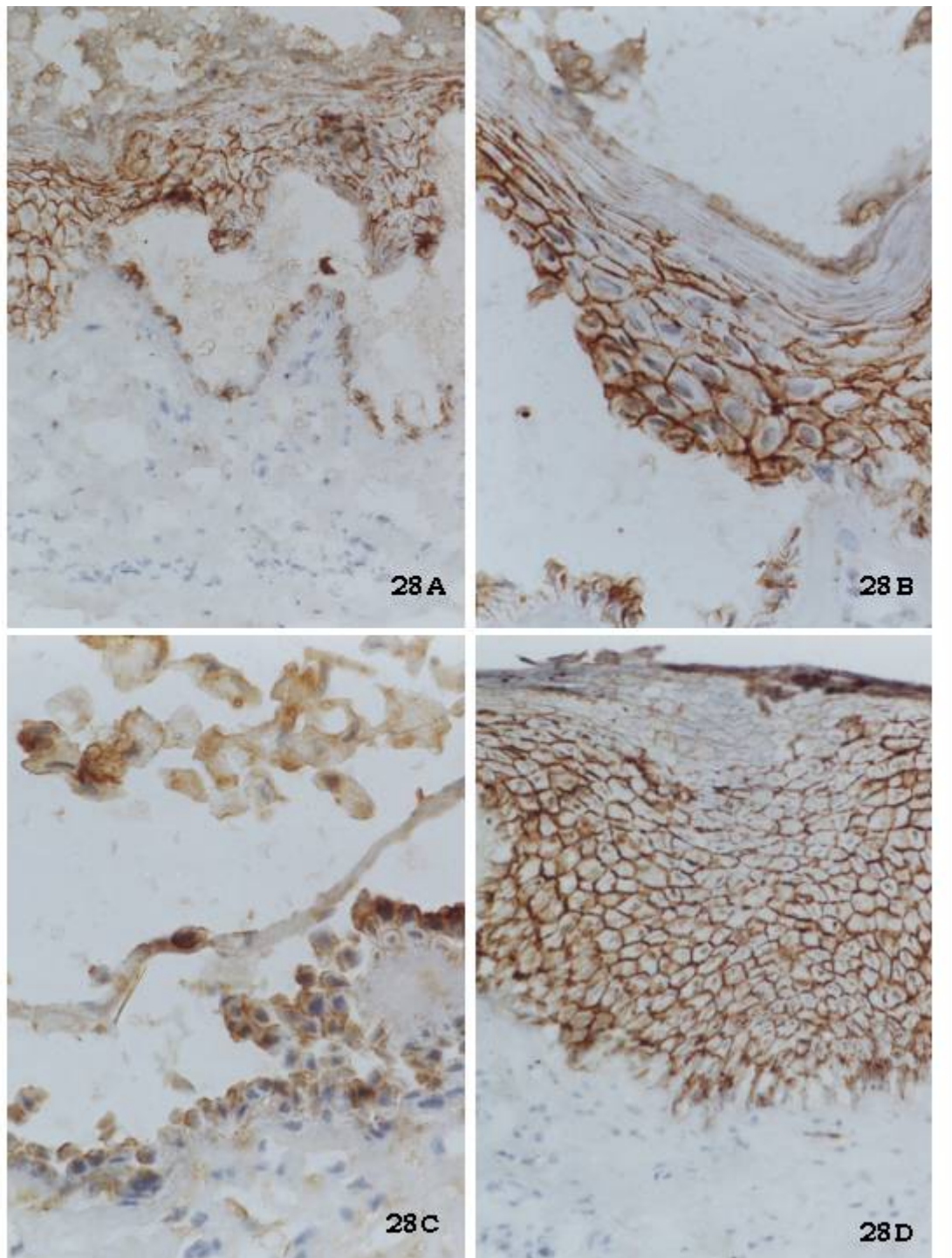


Figura 28 - Estudo da distribuição das desmoplaquinas I/II na Genodermatose Mecanobolhosa. (28A) Pele submetida à fricção leve. Tanto no assoalho como no teto da fenda há marcação típica. (28B) Detalhe do teto da fenda onde se observa marcação da membrana. (28C) Pele submetida à fricção moderada. Células acantolíticas perderam a marcação de membrana e apresentavam marcação difusa. (28D) Pele cicatrizada com marcação característica de membrana.

DESMOGLEÍNA

Não foi possível obter-se marcação com o anticorpo primário antidesmogleína no material utilizado como controle positivo da técnica. Utilizaram-se cortes de congelação e parafina, de pele e mucosa esofágica de búfalos e bovinos. Foram testadas diluições desde 1:1 até 1:800, e, em nenhum dos casos obteve-se qualquer sinal de marcação. Vale comentar que o próprio fabricante do anticorpo em questão ressalta que ele ainda se encontra em fase de testes e que seus resultados estão sujeitos a falhas. Portanto este anticorpo tem propósito exclusivo de pesquisa e não deve ser utilizado em diagnóstico.

Avaliação pela Microscopia Eletrônica de Transmissão

Animais Controle: Pele Normal

Complexos Juncionais

HEMIDESMOSSOMOS

Os hemidesmosomos estavam presentes em grande quantidade. Placas eletrodensas foram observadas a intervalos regulares na membrana plasmática (Figura 29A). Tonofilamentos estavam associados a essas placas. Duas zonas, uma eletrofluorescente e imediatamente abaixo desta, uma outra eletrodensa, que constituem respectivamente a lâmina lúcida e a lâmina densa, foram observadas seguindo o contorno da superfície basal dos queratinócitos basais. A lâmina densa estava associada com o tecido conjuntivo da zona sublâmina densa. Nessa última foi possível identificar as fibrilas de ancoragem, especialmente nos locais correspondentes às placas densas da membrana plasmática (Figura 29B).

DESMOSSOMOS

Foram evidenciados desmosomos nas superfícies laterais e apicais dos queratinócitos basais. Eram mais escassos nas superfícies laterais (Figura 29C).

Os desmosomos ocorreram nos estratos suprabasais em grande quantidade, com formas, tamanho e número muito variados (Figura 29D). De um modo geral tenderam a ser maiores nos estratos espinhoso e granuloso. Seus remanescentes eram claramente discerníveis nos estrato córneo. Independente da sua localização, eles estavam distribuídos em intervalos irregulares em projeções da membrana plasmática dos queratinócitos. Pôde-se evidenciar a estrutura clássica do desmosomo. Eles eram constituídos por duas placas densas, uma mais interna e uma mais externa, em cada uma das membranas plasmáticas dos queratinócitos associados. A partir dessas placas partiam bandas de tonofilamentos em direção ao citoplasma.

Possuíam uma área eletrolucente no espaço intercelular, no centro da qual observou-se a linha densa média (Figura 29E).

Estrato Basal

Os queratinócitos apresentaram-se como células colunares altas, com núcleos tendendo a ovalados e com seu eixo principal perpendicular à JDE. Possuíam membranas plasmáticas bem distintas e complexos juncionais evidentes tanto na face basal como nas faces laterais. O espaço intercelular era escasso, mesmo nas amostras submetidas à fricção intensa (Figura 30A). No citoplasma, os filamentos de queratina puderam ser visualizados como feixes e bandas densos dispostos, na maioria, das vezes ao longo do eixo principal da célula e paralelos ao núcleo. Melanossomos compostos foram um achado freqüente nestas células e se distribuía tanto na periferia da célula como nas proximidades do núcleo. Mitocôndrias eram também muito abundantes nessas células e se tornavam mais escassas nas camadas sobrejacentes. Os melanócitos presentes na camada basal foram reconhecidos pelo seu citoplasma pálido, ausência de tonofilamentos e desmosomos, o que ocasionava sua separação (como artefato) dos queratinócitos adjacentes. Melanossomos foram observados especialmente em finas projeções dos melanócitos, que estavam em contato íntimo com os queratinócitos adjacentes.

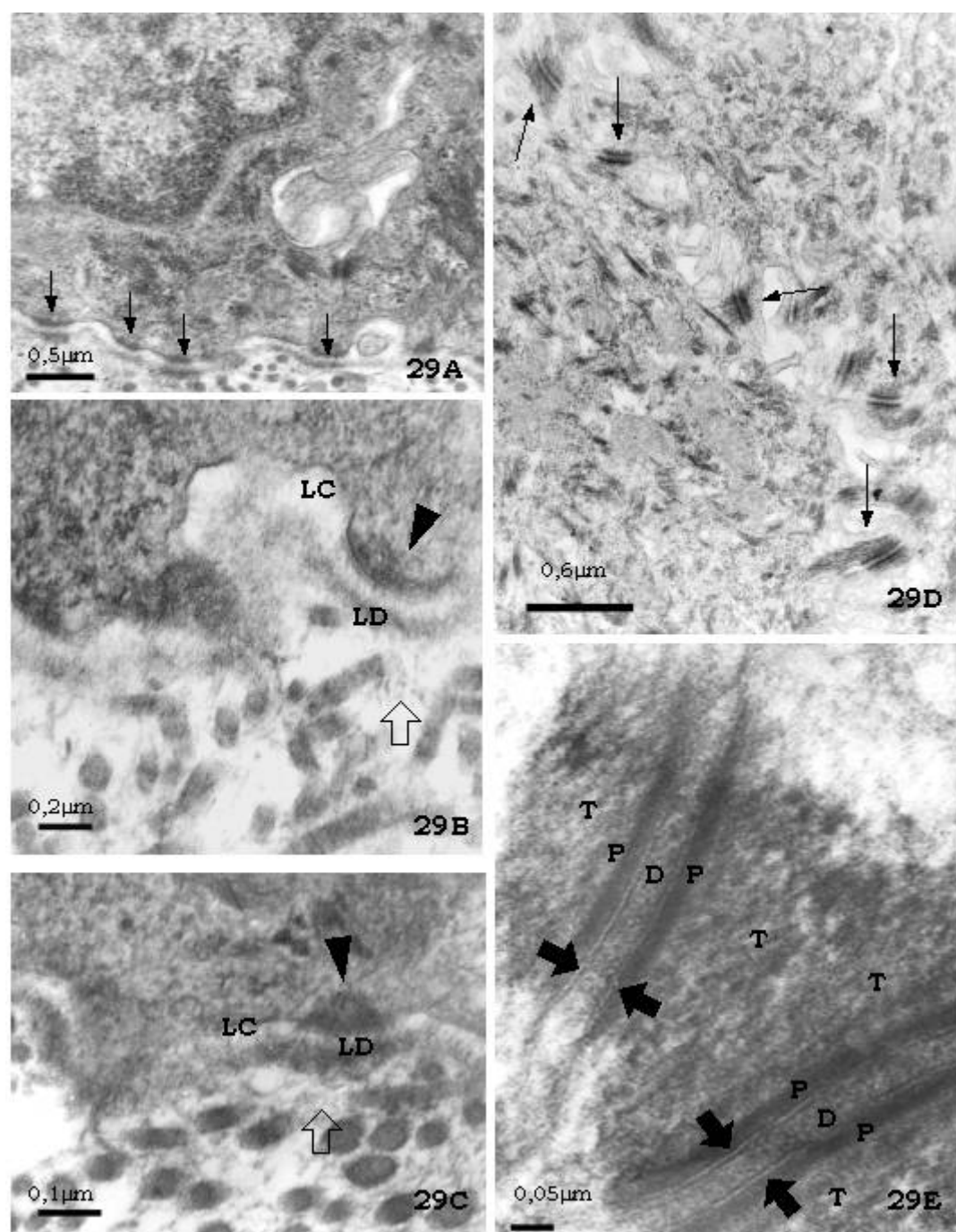


Figura 29 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da pele dos búfalos controles.

(29A) Hemidesmosomos (↓) a intervalos regulares na JDE. (29B e 29C) Hemidesmosomos constituídos pela placa eletrodensa (▼), lâmina lúcida (LC), lâmina densa (LD) e filamentos de ancoragem (↑). (29D) Numerosos desmosomos (↓) com morfologia variada. (29E) Detalhe de dois desmosomos onde se observam os tonofilamentos (T) aderidos às placas (P), a dupla membrana celular (↕) e a desmoglea (D).

Estrato Espinhoso

Nessa camada, observaram-se queratinócitos poligonais grandes que continham núcleos arredondados. Os feixes e bandas de filamentos intermediários de queratina eram mais curtos e finos que os observados na camada basal e se direcionavam de forma aleatória, por vezes se tornando mais escassos na periferia dos núcleos. Melanossomos foram encontrados em todo citoplasma, sem qualquer distribuição preferencial. Organelas túbulo-vesiculares revestidas por membranas e mitocôndrias foram observadas. O espaço intercelular desses queratinócitos também era escasso, independente da intensidade de fricção à qual foram submetidos (Figura 30B).

Numerosos desmosomos de tamanhos variados, embora geralmente grandes, foram observados a intervalos irregulares nas membranas plasmáticas dos queratinócitos do estrato espinhoso. Apresentavam estrutura idêntica à descrita para aqueles dos queratinócitos basais. Densos feixes de tonofilamentos partiam das placas densas desses desmosomos.

Estrato Granuloso

Nessa camada observaram-se os corpúsculos de Odland, gotículas lipídicas e a presença de grânulos de querato-hialina (Figura 30C), ligados à tonofilamentos que por sua vez estavam circundados por numerosos ribossomos.

Estrato Córneo

No estrato córneo encontraram-se queratinócitos cujas organelas não eram mais discerníveis (Figura 30D). Observou-se a membrana plasmática espessa. Os remanescentes de desmosomos eram abundantes e estavam dispersos no espaço intercelular de queratinócitos adjacentes. Eles apareceram como estruturas relativamente eletrodensas e alongadas.

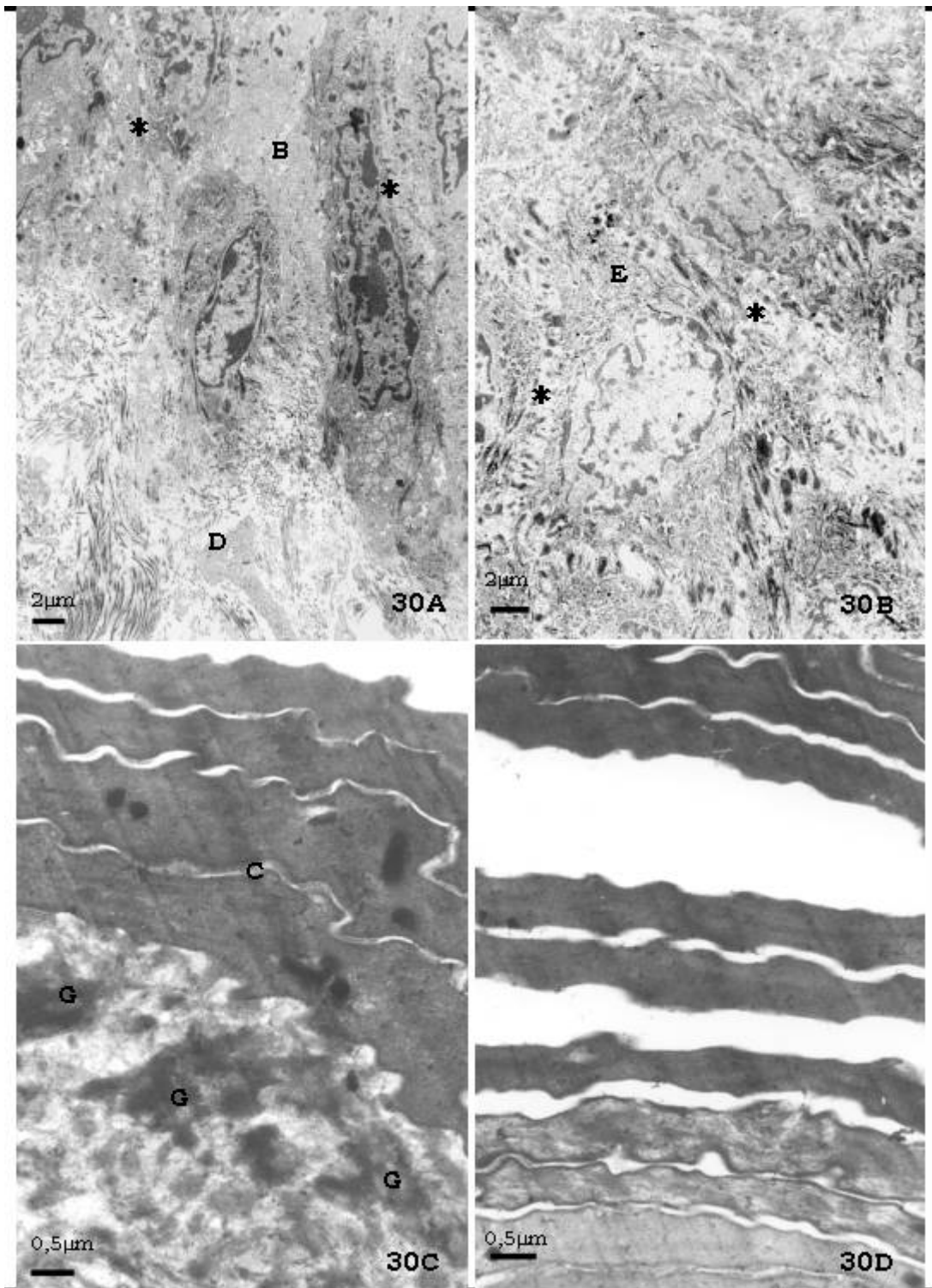


Figura 30 - Microscopia Eletrônica da pele de animais controle. (30A) Camada basal (B) aderida à derme (D). Nota-se o escasso espaço intercelular (*). (30B) Camada Espinhosa (E) com células bem coesas e espaços intercelulares estreitos (*). (30C) Última célula da camada granulosa com grânulos de querato-hialina (G) e primeiras

células da camada córnea (C). (30D) Detalhe da camada córnea formada por células com membranas espessas e cujas organelas desapareceram.

Animais Portadores da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah

Complexos Juncionais

JUNÇÃO DERMO-EPIDÉRMICA

Não foram observadas alterações na JDE nas peles de animais afetados pela Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. A superfície basal dos queratinócitos basais permaneceu firmemente aderida à derme subjacente (Figuras 31A e 31B).

Os hemidesmossomos foram facilmente evidenciados e possuíam estrutura compatível com a estrutura dos hemidesmossomos de animais controle. A integridade da membrana plasmática, na qual se observavam as zona eletrodensas correspondentes aos hemidesmossomos, pôde ser constatada. Subjacente a esta, observaram-se as lâminas lúcida e densa. A zona sublâmina densa encontrava-se também normal. Estavam presentes numerosos filamentos de ancoragem, especialmente associados aos hemidesmossomos (Figuras 31B e 31C).

DESMOSSOMOS

Desmossomos íntegros e conseqüentemente queratinócitos coesos foram observados nas peles íntegras e cicatrizadas. Eles pareciam normais quanto ao número, forma e distribuição (Figura 32A). Os desmossomos individuais eram indistinguíveis daqueles de animais normais, pois ambos apresentaram dupla-membrana lipídica bem definida, placas densas de ancoragem para tonofilamentos e domínios extracelular e com o disco eletrodense típico no centro, que era formado por material floculento (Figura 32B).

Nas áreas de lesão, observou-se que os desmossomos com estrutura clássica tendem a desaparecer (Figura 32C), seja das superfícies laterais dos queratinócitos basais ou das demais superfícies de queratinócitos suprabasais. Observaram-se apenas remanescentes das placas densas, na superfície de cada membrana plasmática de queratinócitos que perderam sua coesão. Nesses casos restava a metade de um desmossomo em cada uma das células adjacentes. A superfície extracelular das metades do desmossomos continha um material finamente floculento (Figura 32D). Nesses locais, retração de tonofilamentos foi um achado freqüente. Eles geralmente se encontravam ainda aderidos às metades de desmossomos. Dependendo o grau de desprendimento das células, alguns desmossomos íntegros ainda eram encontrados em células parcialmente coesas. Eles tinham morfologia normal. Nas células acantolíticas, também foram encontradas metades de desmossomos. Nelas, não se notaram desmossomos íntegros.

Estrato Basal

As amostras de pele íntegra, pele perilesão e cicatrizada tinham estrutura normal (Figura 33A). Nas áreas de lesão de peles submetidas à fricção de leve a intensa, os queratinócitos da camada basal mantiveram sua adesão normal à derme através da JDE íntegra. Por vezes, verificou-se aumento dos espaços intercelulares. Nas suas

membranas, numerosos microvilos podiam ser encontrados (Figura 33B). Notou-se, ainda, a perda parcial da adesão das faces laterais dos queratinócitos basais (Figura 33C), também evidenciada pelo aumento dos espaços intercelulares e redução no número de microvilos e desmossomos. Desmossomos íntegros normais ainda eram percebidos entre esses queratinócitos parcialmente coesos.

Perda total da coesão entre os queratinócitos foi observada na superfície das células basais (Figura 33D), que apresentava-se quase irregular, um tanto achatada, sem projeções e sem desmossomos íntegros. Essa alteração determinava o aparecimento da fenda suprabasal. A linha de queratinócitos basais remanescentes formava o assoalho da fenda e caracterizava a citoarquitetura típica de “lápides de túmulos”. O núcleo e o citoplasma das células basais estavam normais, embora houvesse discreta dispersão dos filamentos de queratina através do citoplasma.

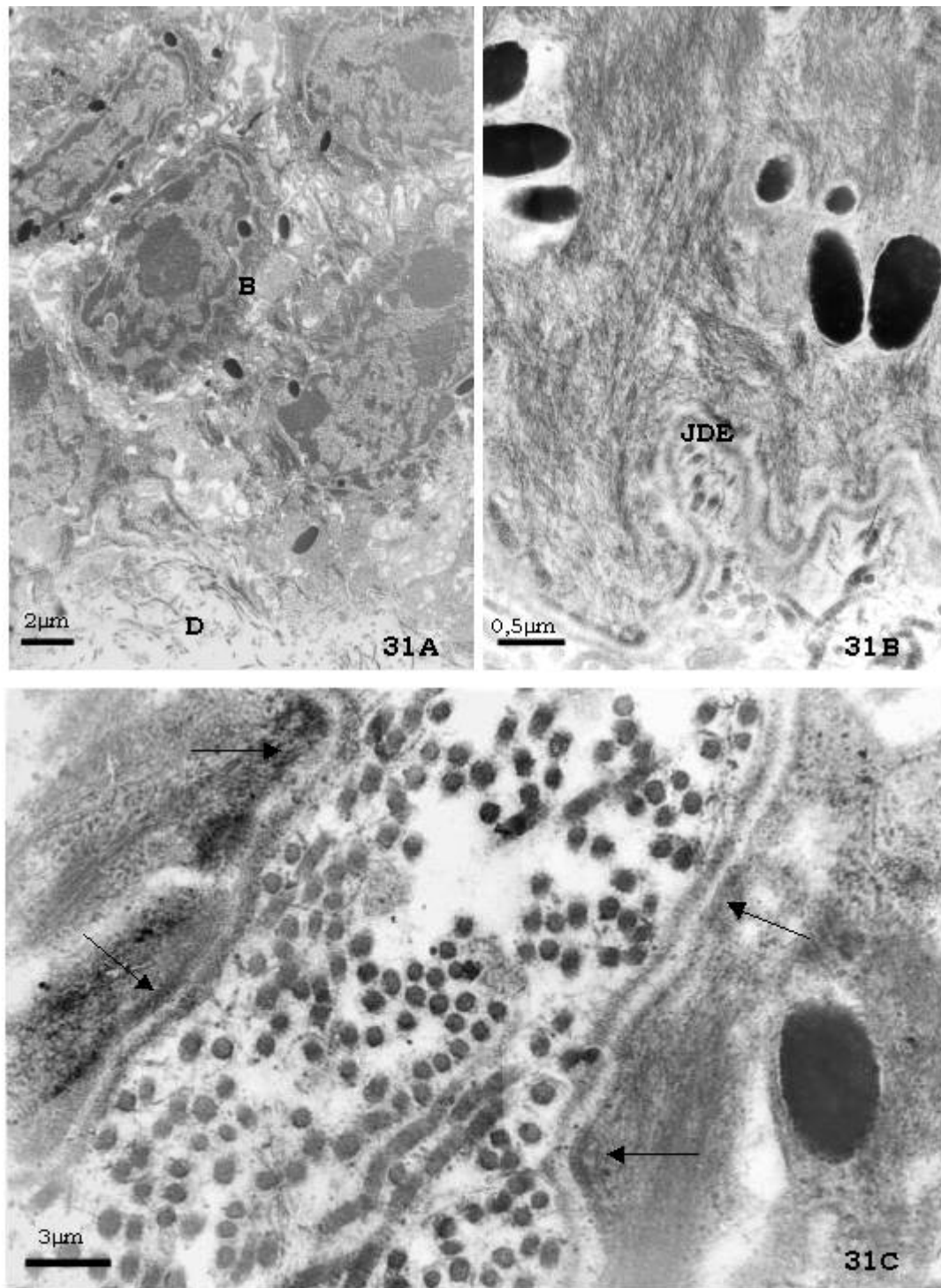


Figura 31 - Microscopia Eletrônica de Transmissão da pele de portadores da Genodermatose de Búfalos Murrah (31A) Células basais (B) firmemente aderidas à derme (D). (31B) A junção dermo-epidérmica (JDE) está preservada. (31C) Todas as estruturas dos hemidesmosomos estão íntegras (↓).

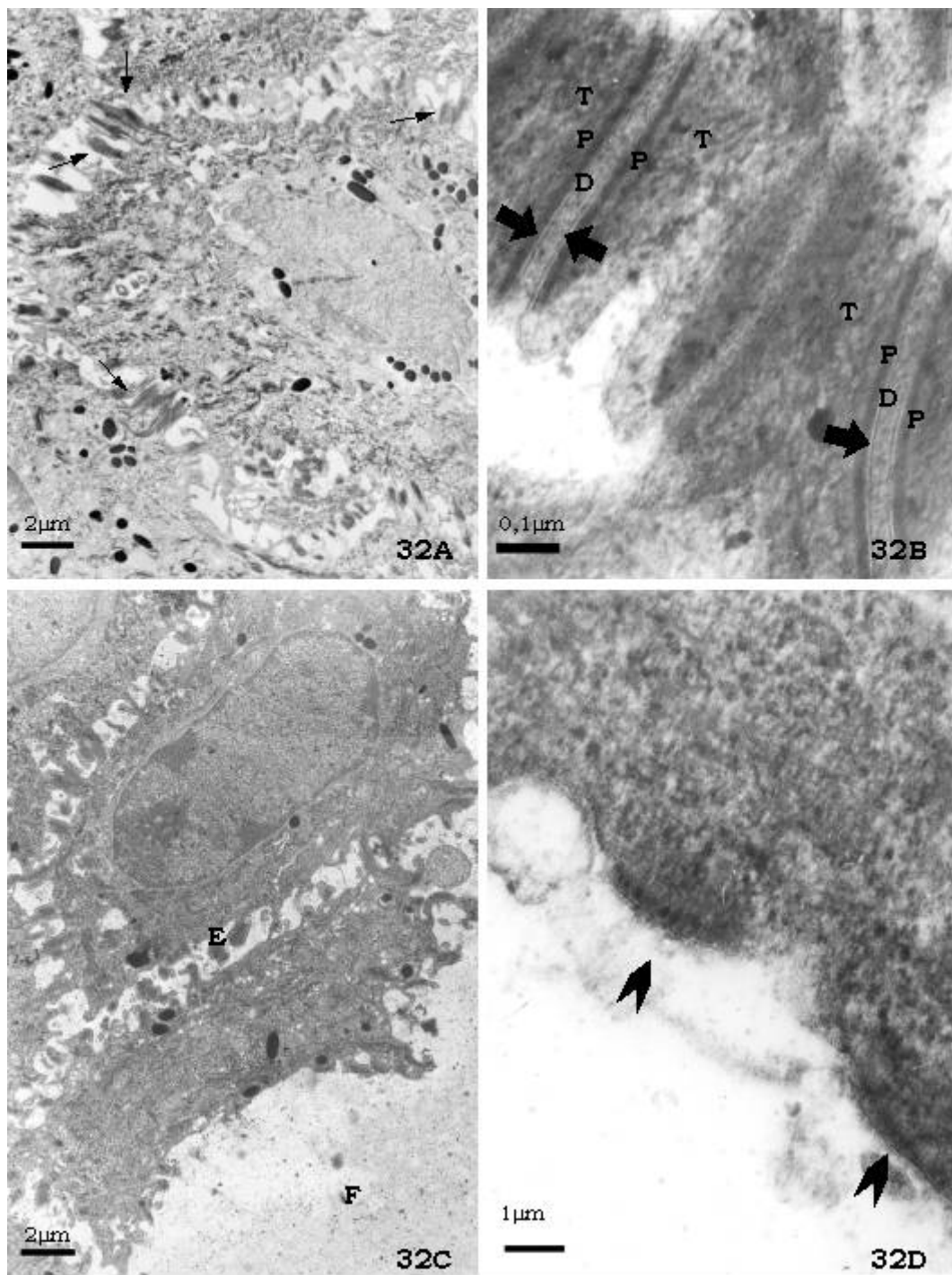


Figura 32 - Microscopia Eletrônica de Transmissão na Genodermatose Mecanobolhosa. (32A) Estrato espinhoso com células coesas e desmossomos íntegros (↓). (32B) Desmossomos íntegros: tonofilamentos (T), placa (P), membrana celular (↓) e desmoglea (D). (32C) Queratinócitos da primeira camada espinhosa (E) formando o teto de uma fenda. (32D) Metades de desmossomos (▲) observadas em células que se desprenderam.

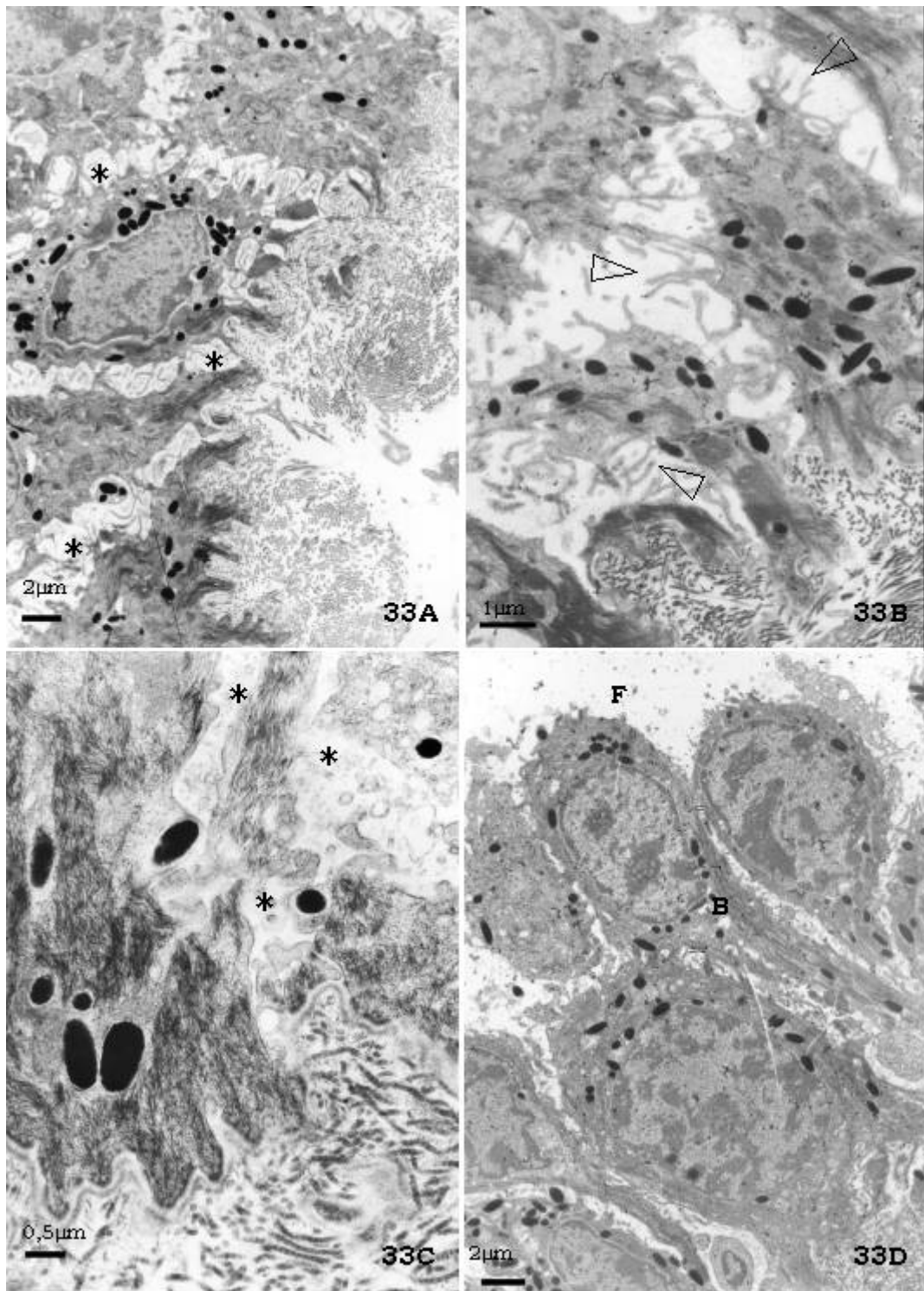


Figura 33 - Microscopia Eletrônica na Genodermatose de búfalos Murrah. (33A) Área perilesão. Aumento dos espaços (*) entre as células basais. (33B) Microvilos (∇) nas membranas celulares. (33C) Perda de coesão na superfície lateral dos queratinócitos (*). (33D) Queratinócitos basais (B) formam o assoalho da fenda (F).

Estrato Espinhoso

Nas amostras de pele intacta ou cicatrizada, o estrato espinhoso estava íntegro, detectando-se apenas um ligeiro aumento dos espaços intercelulares (Figura 34A).

Nas amostras de pele submetida à fricção, as áreas perilesão demonstravam queratinócitos coesos, embora o espaço celular também estivesse bastante aumentado. O conjunto de queratinócitos nos diferentes estratos assumia aspecto de células frouxas (Figura 34B). Nesses casos, os feixes e bandas de filamentos intermediários de queratina mantiveram sua disposição e distribuição originais.

Nas áreas de lesão, caracterizadas pela presença das fendas, houve desprendimento total entre as células do estrato basal e espinhoso. A face inferior desses queratinócitos mostrava-se mais regular. Por vezes era possível encontrar metades de desmosomos nas faces inferiores desses queratinócitos (Figura 34C).

As faces laterais dos queratinócitos espinhosos que formavam a primeira camada de células do teto da fenda podiam manter-se parcialmente coesas. Nestas células notavam-se grandes microvilos que se estendiam através dos espaços dilatados entre as células adjacentes. Eles geralmente eram finos e alongados ou pareciam seccionados quando os espaços intercelulares eram muito grandes. Desmosomos íntegros também eram encontrados nessas áreas (Figura 34D). Nas faces laterais dos queratinócitos onde houve perda total de coesão, havia o desaparecimento dos desmosomos ou suas metades eram detectadas em associação com os tonofilamentos, que ainda mantinham sua distribuição habitual na célula. Microvilos bizarros também eram observados na membrana desses queratinócitos. Os queratinócitos suprajacentes mantinham suas características preservadas, embora com um ligeiro aumento dos espaços intercelulares e presença de algumas vilosidades.

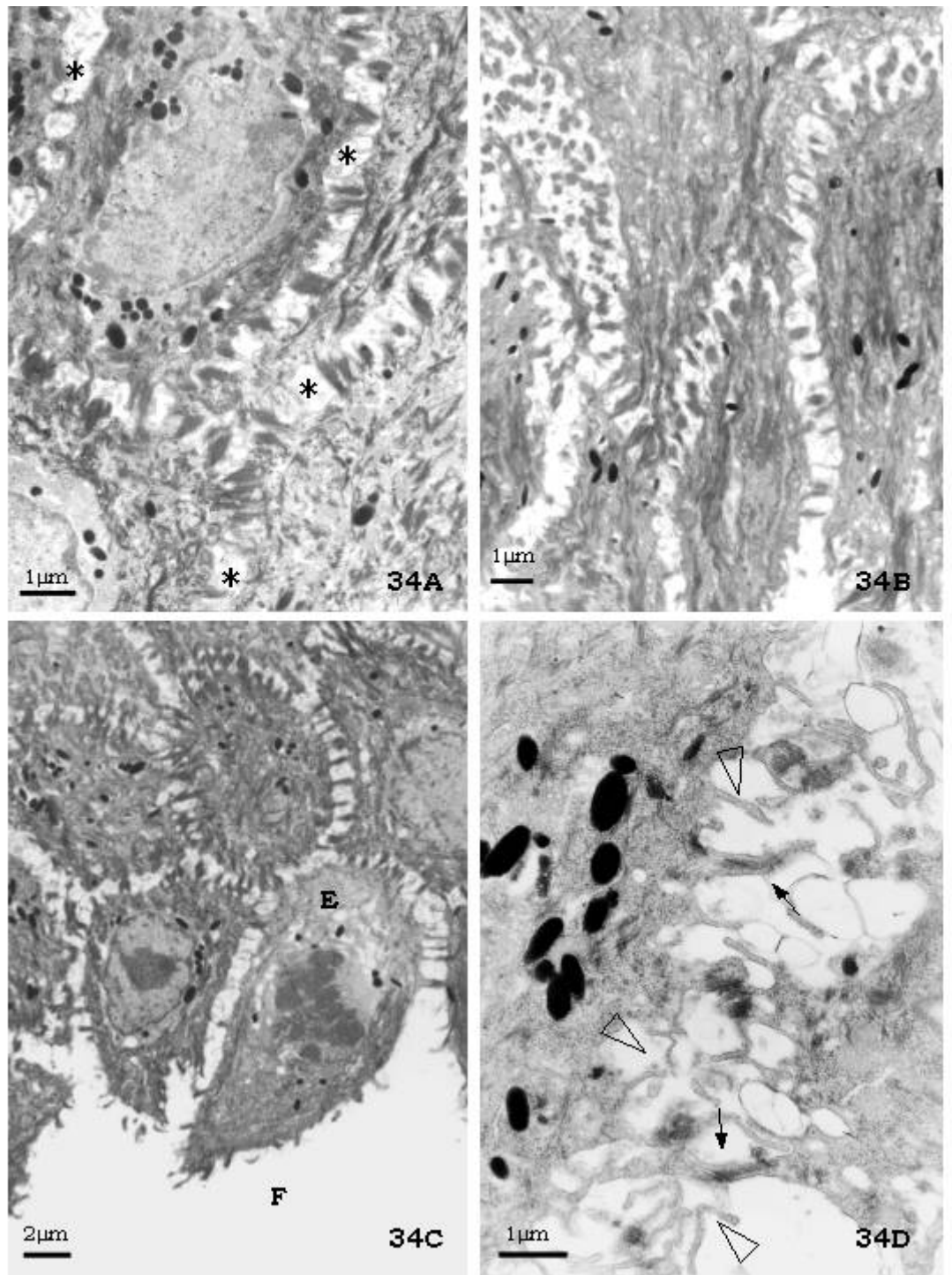


Figura 34 - Microscopia Eletrônica na Genodermatose Mecanobolhosa. (34A) Pele íntegra demonstrando ligeiro aumento dos espaços intercelulares (*). (34B) Pele perilesão e teto da fenda apresentaram células frouxas. (34C) Células espinhosas (E) que se desprenderam totalmente das basais contituíram o teto da fenda (F). As faces laterais destas células permaneceram parcialmente coesas. (34D) Microvilos (▽) e desmosomos íntegros (↓) nas faces laterais de queratinócitos espinhosos (E).

Observou-se, ainda, perda total de coesão entre os queratinócitos do estrato espinhoso o que possibilitou o aparecimento de células acantolíticas no interior da fenda (Figura 35A). Essas células assumiam aspecto alongado ou arredondado não possuíam desmossomos, embora alguns resquícios de complexos juncionais fossem encontrados (Figura 35B). Elas possuíam núcleo normal. Em algumas, notou-se que os filamentos intermediários ficavam dispersos de forma aleatória pelo citoplasma e perdiam a distribuição em feixes e bandas (Figura 35C e 35D).

Estratos Granuloso e Córneo

Tanto na pele íntegra (perilesão) como na lesada, ou seja, quando o estrato granuloso constituía o teto da fenda, a única alteração observada em relação às amostras controle foi um discreto aumento dos espaços intercelulares.

Estruturas típicas do processo de queratinização, como grânulos de querato-hialina associados a tonofilamentos e numerosos ribossomos pareceram normais quanto ao número e forma.

Em todas as amostras avaliadas, os queratinócitos do estrato córneo não apresentaram qualquer alteração morfológica aparente, sendo possível identificar claramente o espesso envelope celular e as fibrilas que os compõem. Atenção especial foi dispensada à avaliação dos remanescentes de desmossomos que estavam presentes em número e morfologia idênticos aos das amostras controle.

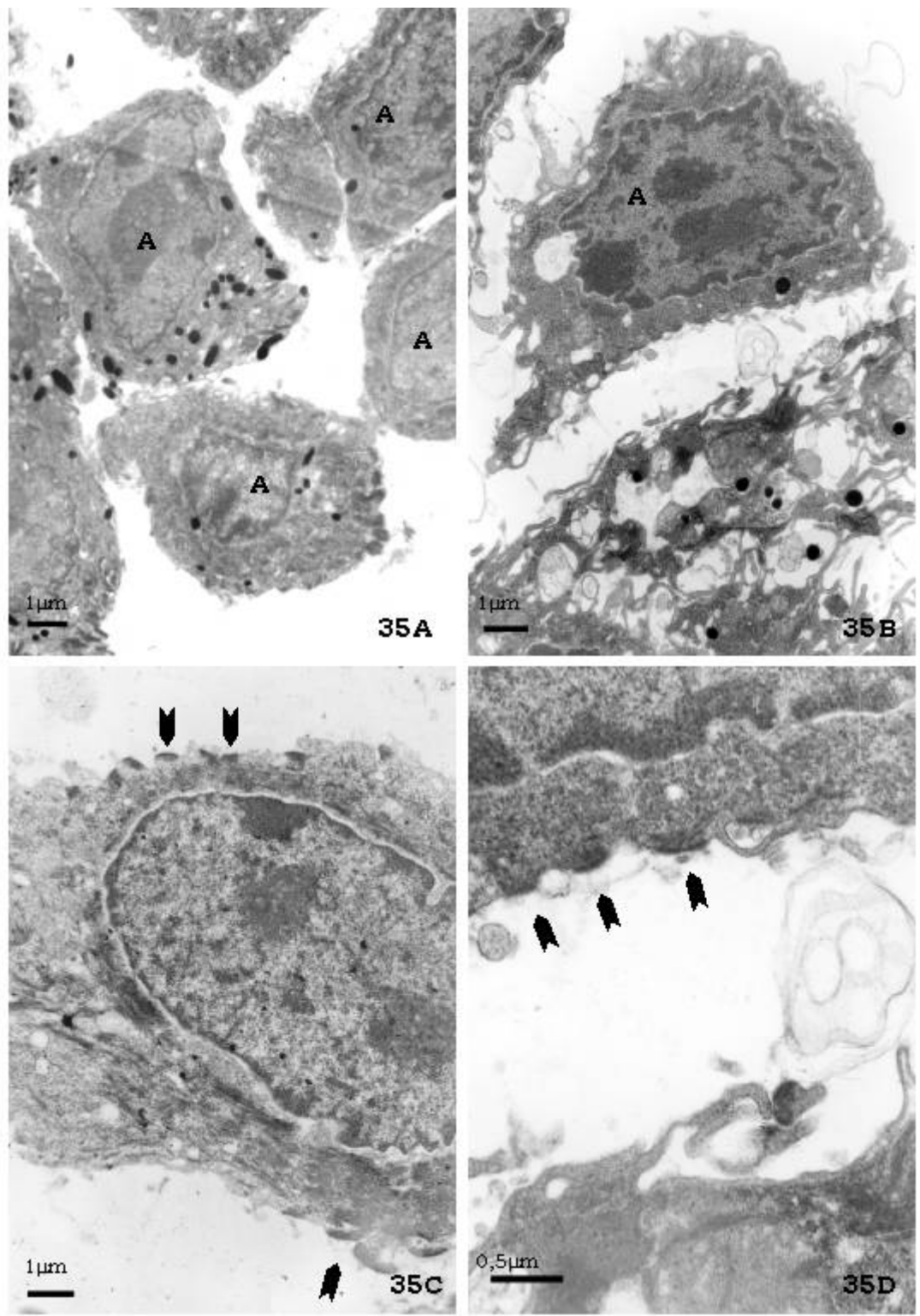
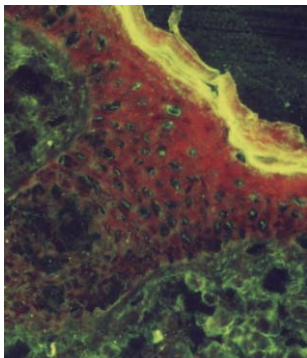


Figura 35 - Microscopia Eletrônica de Transmissão na Genodermatose dos Búfalos Murrah. (35A) Células acantolíticas (A) no interior da fenda. Elas assumem aspecto arredondado ou (35B) alongado. (35C e 35D) Nota-se a presença de metades de desmossomos (▲) ou ausência desses nas células acantolíticas.

Discussão



DISCUSSÃO

Considerações sobre o Padrão de Herdabilidade da Genodermatose

Mecanobolhosa e sua Incidência no Rebanho Experimental

O rebanho experimental foi criado com o objetivo de prover mais animais para o estudo da Genodermatose Mecanobolhosa. Como visto em estudo prévio (RIET-CORREA et al, 1994), a doença tem caráter autossômico recessivo, cujo fenótipo se expressa apenas em indivíduos homocigotos, e que devem ter herdado um alelo mutante de cada um dos genitores, que por sua vez são heterocigotos para esse gene (portadores). Neste caso, o risco de seus filhos serem afetados, é de um em quatro (THOMPSON et al, 1991). Assim sendo, em condições normais seria necessário um período muito grande para se obter o número de animais afetados necessário para o estudo.

Sabe-se que em circunstâncias normais, o risco de qualquer portador ter um filho afetado depende em parte da frequência de portadores na população em geral. O princípio básico do fundamento da genética populacional baseia-se em que os genótipos se distribuem proporcionalmente às frequências dos alelos numa população e permanecem constantes de geração em geração, isso constitui a Lei de Hardy-Weinberg. A população que demonstra as características básicas dessa lei está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (THOMPSON et al, 1991).

Vários fatores afetam o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os principais são os que fogem da premissa do acasalamento aleatório e dentre eles estão incluídos a estratificação¹, o cruzamento preferencial² e o acasalamento consanguíneo³ (THOMPSON et al, 1991).

A chance de nascer um indivíduo afetado por uma doença de caráter autossômico recessivo aumenta pelo menos uma ordem de magnitude se os pais forem aparentados. Alterações na estrutura da população por migração, a qual modifica gradualmente as frequências dos genes, também determina a falhas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (THOMPSON et al, 1991).

Assim sendo, para a obtenção dos animais afetados, foi necessário fugir-se do padrão de acasalamentos aleatórios e induzir acasalamentos baseados em cruzamentos consanguíneos e no cruzamento preferencial, nesse caso, tentando exacerbar um fenótipo indesejado para animais de produção, mas adequado para o estudo.

O aparecimento da doença no Brasil também se deve à quebra das premissas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Deve-se lembrar que a doença apareceu somente após terem sido realizados cruzamentos consanguíneos, uma vez que havia escassez de reprodutores no país (RIET-CORREA et al, 1994; FERNANDES et al, 1996).

Além disso, deve-se considerar que a frequência de alelos mutantes que poderiam inclusive desaparecer em populações normais, tende a flutuar de geração para geração em populações pequenas e/ou isoladas. Esse fenômeno denomina-se Deriva Genética e se refere ao estabelecimento de alelos mutantes numa população e a formação de uma subpopulação com frequências de genes muito diferentes das da população original (THOMPSON et al, 1991), como foi o caso do rebanho em questão.

¹ Sub-grupos acasalam-se entre si, mantendo-se geneticamente distintos

² Escolha de um indivíduo para acasalamento por ele possuir uma característica em especial.

³ Conhecido também como endocruzamento. Como as situações anteriores, determina aumento de genótipos homocigóticos e redução na forma heterocigótica correspondente.

Deve-se levar ainda em conta que o aparecimento e estabelecimento da Genodermatose nos animais deste rebanho teve ainda influência do fenômeno conhecido como “Efeito do Fundador”, que se baseia no fato de que qualquer nova população geralmente é criada a partir de um pequeno número de indivíduos fundadores. Se um deles carrega um gene mutante, a prevalência desse gene se torna mais comum nessa nova população (JOLLY, 1993).

Esse fenômeno foi descrito em humanos portadores de Epidermólise Bolhosa (EB) Juncional subtipo Herlitz com ascendência paquistanesa. Aparentemente não havia relação entre as famílias dos portadores, que vinham de diferentes regiões do Paquistão. Posteriormente foi verificado que todos os doentes apresentavam um mesmo polimorfismo intragênico e três polimorfismos microsatélite próximos ao locus LAMA3. Assim foi demonstrada a propagação de um alelo mutante ancestral em populações do Paquistão, até descendentes aparentemente não relacionados (McGRATH et al, 1996).

O problema pode ser amplificado se um único reprodutor ou família exercer uma grande influência numa população. Isso ocorre freqüentemente em veterinária, especialmente quando métodos de reprodução artificial são empregados (JOLLY, 1993).

Nos búfalos Murrah, foi determinado que o touro Andad da Cachoeira RD01 devia ser heterozigoto para do gene da doença (RIET-CORREA et al, 1994). Este animal foi um reprodutor importante no estabelecimento do rebanho brasileiro, pois seu sêmen foi comercializado por todo país, especialmente depois que foram proibidas importações de novos reprodutores da Índia (FERNANDES et al, 1996). Provavelmente ele exerceu influência sobre o rebanho brasileiro, imprimindo ao mesmo tempo características desejáveis, mas também exercendo o “Efeito de Fundador” na transmissão do gene causador da Genodermatose Mecanobolhosa dos búfalos Murrah. Considerando que a maioria dos genes dos distúrbios autossômicos recessivos está presente mais nos portadores do que em indivíduos homozigotos e que esses genes podem ser transmitidos nas famílias por numerosas gerações sem jamais aparecer na forma homozigótica (THOMPSON et al, 1991), alerta-se para o aparecimento e fixação da doença no rebanho bubalino do Brasil.

Estudo a Patogenia da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah

Imunofluorescência Direta

A IFD é uma técnica que detecta a presença de imuno-reagentes ligados ao tecido (como fibrina, complemento ou anticorpos). Em geral, os imuno-reagentes estão presentes nos tecidos apenas nos casos caracterizados por resposta auto-imune a um componente específico dos queratinócitos ou da JDE, embora a retenção de imunocomplexos nos vasos sangüíneos da derme possa ocorrer em algumas outras doenças (FINE et al, 1993).

A IFD ainda é uma das técnicas de maior importância na pesquisa e diagnóstico de doenças auto-imunes. Em todas as formas de pênfigo a IFD demonstra anticorpos intercelulares em quase todos os casos. Eles são geralmente da classe IgG, embora IgM e IgA também possam ser encontrados. Complemento também é encontrado com freqüência (BLACK et al, 1983).

No Penfigóide Bolhoso pode-se observar depósitos lineares de IgG e complemento na JDE na pele perilesão, em praticamente todos os casos. Em um terço dos pacientes depósitos de IgM, IgD e IgE também podem estar presentes e fluorescência na JDE pode ser demonstrada. O Penfigóide Cicatricial apresenta praticamente o mesmo padrão de IFD que o Penfigóide Bolhoso. As duas doenças devem ser diferenciadas através de IF indireta (BLACK et al, 1983).

Estudos em biópsias de pele de pacientes com Dermatite Herpetiforme revelam que a IFD tem valor considerável para diferenciá-la de outras dermatites pruriginosas crônicas. Na Dermatite Herpetiforme podem ser encontrados depósitos lineares de IgA. A interpretação deste depósito de IgA pode gerar controvérsias, pois a Dermatite Herpetiforme deve ser diferenciada do Penfigóide Bolhoso por características clínicas, histológicas, de padrão de IFD e resposta ao tratamento. O diagnóstico diferencial se torna ainda mais difícil quando se considera a possibilidade de Dermatose Bolhosa IgA Linear (BLACK et al, 1983) ou quando ocorre a associação de doenças como o Penfigóide Bolhoso e a Dermatose Bolhosa IgA Linear (KERSTING et al, 2000).

Na Epidermólise Bolhosa Adquirida pode haver deposição de IgG e C3 na JDE da pele perilesão. Deposição de IgA, IgM e fibrina também são encontradas (BLACK et al, 1983). Nesse caso, a deposição linear dos imuno-reagentes reflete a auto-imunidade ao colágeno tipo VII (FINE et al, 1993).

Na avaliação das EBs, a imunofluorescência vem sendo utilizada para quantificar e localizar estruturas dos queratinócitos ou da JDE. Para tal, é utilizado um painel de anticorpos poli e monoclonais contra estas estruturas, cuja localização e distribuição normais deve ser bem conhecida. O nível da clivagem, para identificação do subtipo de EB, pode também ser determinado através da IFD com o uso de anticorpos contra estruturas da JDE (FINE et al, 1993).

A ausência de imunofluorescência para imunoglobulina da classe IgG em todas as amostras de pele, normal ou lesada, de búfalos portadores da Genodermatose Mecanobolhosa testadas revela que não há deposição desse anticorpo nas peles dos animais testados. A eficiência do conjugado foi demonstrada através do resultado positivo nos linfonodos e negativo nas peles de doentes.

Sabe-se da confiabilidade do diagnóstico de doenças auto-imunes através da IFD. Nos Pênfigos cerca de 70-80% dos portadores da doença são identificados através de testes de IFD (SUTER et al, 1998) e no Lúpus, 90% dos casos são diagnosticados pela IFD (SCOTT et al, 1980). Resultados falso-negativos invariavelmente estão ligados à colheita inadequada da pele, que deve conter lesões primárias, e ao tratamento do paciente com glicocorticóides no período da obtenção das amostras (SCOTT, 1989).

As situações que poderiam gerar resultados falso-negativos foram evitadas no transcorrer desse trabalho. As áreas de colheita das amostras foram selecionadas cuidadosamente e os animais não estavam sendo submetidos a qualquer tipo de tratamento nesse período. Além disto, buscou-se realizar os testes no maior número de amostras possível, para evitar que algum falso-negativo que porventura ocorresse, prejudicasse o resultado final do trabalho.

As mesmas considerações podem ser feitas em relação ao resultado negativo para deposição de C1 e C3 nas peles de búfalos doentes.

Pode-se afirmar, então, que como não houve deposição de auto-anticorpos da classe IgG ou complemento nas peles dos búfalos afetados pela Genodermatose Mecanobolhosa, a doença não se trata de um processo auto-imune ou imunomediado,

já que a IFD é uma técnica importante no diagnóstico de doenças vésico-bolhosas de caráter auto-imune (BLACK et al, 1983).

Imuno-Histoquímica

Pesquisa de Auto-anticorpos com Anti-Imunoglobulinas de Bovinos

A falha na imunomarcagem de imunoglobulinas de búfalo com as anti-imunoglobulinas de bovinos foi um evento inconveniente na realização deste estudo, embora não o tenha inviabilizado.

Precauções, como o teste de ELISA prévio para verificar a reatividade cruzada entre as Igs das duas espécies, foram tomadas no sentido de evitar esse problema.

Deve-se considerar, no entanto, que alguns anticorpos, especialmente os monoclonais que são produzidos utilizando-se proteínas desnaturadas e selecionados por meios não-morfológicos, podem ser altamente específicos para ELISA, mas não funcionam adequadamente na imuno-histoquímica tecidual (BATIFORA, 1991).

A homologia das imunoglobulinas nas diferentes espécies vem sendo alvo de vários estudos. Alguns visam identificar as relações filogenéticas entre as espécies (CURTAIN & FUDENBERG, 1973) e outros buscam possibilitar o uso de imunoglobulinas de diferentes espécies para estudos de imunopatologia. Existem três critérios para estabelecer a homologia das classes de imunoglobulinas entre as diferentes espécies. O primeiro e mais direto é o estabelecimento das similaridades na estrutura primária da imunoglobulina. O segundo e terceiro critérios se baseiam, respectivamente nas semelhanças funcionais e físico-químicas delas. Por outro lado, o estudo da reatividade cruzada parece ser a alternativa mais prática para demonstrar similaridades da estrutura e, por conseqüência, prover um direcionamento para o estabelecimento da homologia das classes de imunoglobulinas (NEOH et al, 1973).

A reatividade cruzada de imunoglobulinas de bovinos com as de outras espécies foi estudada em testes de ELISA. Epítomos das cadeias pesadas de IgM e IgA mantiveram algum grau de reatividade entre todas as espécies testadas, inclusive aves. Os melhores resultados foram obtidos para os Ovinos e o Bisão. Búfalos apresentaram 42% e 94% de reatividade cruzada para IgM e IgA de bovinos. Já a IgG₁ e IgG₂ reagiram minimamente entre as espécies testadas (Quadro 8). Para búfalos houve 5% e 8%, respectivamente, de reatividade cruzada (HENNING & NIELSEN, 1992). Assim sendo, ficam claras as dificuldades no uso de imunoglobulinas de uma espécie para detecção das de outra.

A tentativa de utilizar a técnica de imuno-histoquímica nesta fase do estudo se deveu ao fato de que a rotina do laboratório e alguns estudos demonstram certas vantagens práticas no uso da imuno-histoquímica em relação à IFD. Dentre elas, destaca-se que para imuno-histoquímica e histopatologia não são necessárias amostras diferentes e que podem ser realizados cortes seqüenciais destinados às duas técnicas, o que pode facilitar a interpretação dos resultados. Na IFD, detalhes morfológicos geralmente são perdidos, ficam inviabilizados estudos retrospectivos, já que a fluorescência é lábil (BRADLEY & MAYS, 1990). A autofluorescência de determinados componentes teciduais pode complicar a interpretação dos resultados (DOHERTY et al, 1989).

Quadro 8 - Percentagem de reatividade cruzada de mAbs para imunoglobulinas bovinas em diferentes espécies.

Classe	Ordem	Família	Taxonomia	Nome comum	Porcentagem de reatividade			
					IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgA
Mamífero	Artiodactylia (sub-ordem Ruminante)	<i>Bovidae</i>	<i>Bos taurus</i>	Bovino	100	100	100	100
		<i>Bovidae</i>	<i>Pocphagus grunniens</i>	Iaque	100	5	7	100
		<i>Bovidae</i>	<i>Bison bison</i>	Bisão	58	13	12	59
	Ruminante	<i>Bovidae</i>	<i>Bubalus bubalus</i>	Búfalo	42	5	8	94
		<i>Bovidae</i>	<i>Ovis aries</i>	Ovino	100	60	43	100
		<i>Bovidae</i>	<i>Capra hircus</i>	Caprino	44	41	7	47
		<i>Cervidae</i>	<i>Rangifer tarandus</i>	Veado	44	3	8	47
		<i>Cervidae</i>	<i>Cervis canadensis</i>	Alce	45	100	8	56
		<i>Cervidae</i>	<i>Rangifer</i>	Caribu	73	3	8	94
		<i>Camelidae</i>	<i>Camelidae camelus</i>	Camelo	42	3	7	50
	Artiodactylia	<i>Suidae</i>	<i>Sus scrofa</i>	Suíno	36	7	10	57
	Primata	<i>Hominidae</i>	<i>Homo sapiens</i>	Humano	5	5	10	68
	Perissodactyla	<i>Equidae</i>	<i>Equus caballus</i>	Equino	34	5	7	85
			<i>Equus zebra</i>	Zebra	35	7	22	59
	Marsupialia	<i>Macropodidae</i>	<i>Macro pus</i>	Canguru	38	5	8	73
	Lagomorpha	<i>Leporidae</i>	<i>Oryctolagus cuniculi</i>	Coelho	38	5	8	73
	Rodentia	<i>Caviidae</i>	<i>Cavia porcellus</i>	Cobaia	35	3	8	62
<i>Muridae</i>			<i>Rattus rattus</i>	Rato	31	5	8	58
<i>Mus musculus</i>			Camundongo	35	7	7	88	
Ave	Galiformes	-	<i>Gallus gallus</i>	Galinha	40	5	8	46
		-	<i>Meleagris gallopavo</i>	Peru	33	3	8	58
		-	<i>Anser albifrons</i>	Ganso	44	3	10	71
		-	<i>Anser platyrhynchos</i>	Pato	38	5	10	

FONTE: Modificado de HENNING & NIELSEN, 1992.

Por outro lado, os resultados diagnósticos obtidos com as duas técnicas se assemelham muito. Embora possa haver uma sensibilidade ligeiramente maior da imuno-histoquímica em relação à IFD, o uso combinado das duas técnicas ainda é necessário para garantir a confiabilidade do diagnóstico (BRADLEY & MAYS, 1990). Além do que, atualmente ainda existe uma disponibilidade maior de reagentes (anticorpos) para IFD do que para a imuno-histoquímica.

Avaliação da Distribuição das Proteínas Desmossômicas

Acredita-se que a patogenia da Genodermatose Mecanobolhosa deva envolver alterações de um ou mais componentes dos desmossomos e talvez também das junções adesivas. Estudos de imuno-histoquímica e IF já foram realizados em outras

genodermatoses que cursam com perda de coesão de queratinócitos, como a Doença de Darier e Hailey-Hailey, visando identificar essas alterações, ou pelo menos direcionar estudos futuros que identificá-las (BURGE & GARROD, 1991; HAKUNO et al, 2000), Dsg3 (HAKUNO et al, 2000).

Os achados no estudo da distribuição das DPs I e II na Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos são condizentes com o que foi observado para as proteínas da placa nas doenças de Darier e de Hailey-Hailey. Nas áreas perilesão de peles de pacientes com a doença de Darier há expressão normal de DpI e DpII, assim como de Dsg1, Dsc2-3, placoglobina e E-caderina (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992). Microscopia imuno-eletrônica indica uma concentração menor de placoglobina nessas áreas (TADA & HASHIMOTO, 1998).

Avaliação das células acantolíticas nas doenças de Darier e de Hailey-Hailey pela imuno-histoquímica (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992) e microscopia imuno-eletrônica (TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000) demonstraram que os componentes desmossômicos se dispersavam pelo citoplasma (BURGE & SCHOMBERG, 1992; TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000), enquanto que as estruturas das junções adesivas ficavam mais restritas à periferia e se difundem apenas parcialmente no citoplasma (HAKUNO et al, 2000; TADA & HASHIMOTO, 1998).

Na doença de Hailey-Hailey a marcação da imuno-histoquímica, IF e microscopia imuno-eletrônica das regiões perilesão e células acantolíticas seguiu o mesmo padrão que na doença de Darier (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992; TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000). Algumas células acantolíticas podem apresentar aglomerados de placoglobina na periferia (BURGE & SCHOMBERG, 1992). Nessa doença a acantólise também precede a marcação intracelular.

Tanto na Doença de Darier de como na de Hailey-Hailey, a internalização de componentes dos desmossomos deve ser um fenômeno secundário à acantólise (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992), e não refletem deficiência na síntese das proteínas das junções (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992).

Na Genodermatose Mecanobolhosa, a imunomarcação pericelular normal para as DPs I e II, mesmo nas áreas de lesão, é um forte indicativo de que o problema não se encontra nas proteínas da placa desmossômica. Como se observa na Síndrome de Displasia Ectodérmica/Fragilidade Epidérmica, que ocorre devido à ausência da placofilina-1, há imunomarcação intracelular difusa para desmoplaquina, além da reatividade na superfície das células. A imunomarcação para os demais componentes dos desmossomos é normal (McGRATH, 1999).

Acredita-se que a marcação difusa no citoplasma de células acantolíticas é um evento secundário à acantólise, da mesma forma que descrito para as doenças de Darier e Hailey-Hailey (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) tem um papel importante no estudo das genodermatoses. É o teste padrão-ouro para o diagnóstico das EBs, pois através

dela é possível definir precisamente o nível ultraestrutural da fenda, assim como verificar a presença ou ausência de outros achados morfológicos associados (FINE, et al, 1993). Além disso, essa técnica tem sido utilizada na identificação de anormalidades de várias fibras, fibrilas ou filamentos e auxilia a localizar os componentes bioquímicos dessas estruturas (EADY et al, 1994).

Enfim, o estudo de doenças de caráter genético através da MET visa, também, detectar defeitos estruturais de componentes celulares, que preferencialmente tenham natureza protéica e dessa forma representem produtos primários dos genes. Com isso busca-se identificar anormalidades que estão diretamente relacionadas ao evento molecular genético e que atuam como marcadores estruturais do problema. Essas alterações devem ser caracterizadas por um tipo de estrutura aberrante bem definida e quase invariável. Os demais constituintes celulares devem ser mais ou menos normais, embora uma seqüência de alterações secundárias possa ser induzida pelo efeito da alteração estrutural primária (ANTON-LAMPRECHT, 1994).

Muitas vezes quando amostras de tecido de uma determinada doença são investigadas pela microscopia eletrônica, muitas das características morfológicas encontradas são inespecíficas ou de natureza secundária. Isso ocorre com freqüência nas doenças vésico-bolhosas, nas quais a separação inicial da epiderme num plano específico pode ser mascarada por alterações secundárias, que se iniciam depois que a bolha é clinicamente visível (ANTON-LAMPRECHT, 1994).

As genodermatoses apresentam uma variedade muito grande de marcadores ultraestruturais, alguns dos quais representam diretamente uma mutação específica (ANTON-LAMPRECHT, 1994).

Classicamente as EBs se caracterizam pela formação de fendas subepidérmicas e desprendimento da epiderme (BRENEMANN et al, 2000).

Na forma juncional da EB em humanos (WEEDON, 1997), caninos (DUNSTAN et al, 1988), potros (JOHNSON et al, 1988) e ratos Sprague-Dawley (BRENEMANN et al, 2000) a fenda ocorre ao longo da lâmina lúcida. Os vários componentes da JDE estão malformados e os hemidesmossomos têm estrutura rudimentar (EADY et al, 1994; BRENEMANN et al, 2000). Esses achados, além de possibilitar o diagnóstico da doença, encaminham para a descoberta das estruturas moleculares envolvidas no problema, como os defeitos no gene LAMB3, que codifica a cadeia $\beta 3$ da laminina-5 (MARINKOVICH, 1995; WEEDON, 1997) e no gene que codifica o BPAg2 (BP180) (MARINKOVICH, 1995; BURGESSON & CHRISTIANO, 1997; WEEDON, 1997).

Os principais marcadores ultraestruturais da forma distrófica da EB são as anormalidades nas fibrilas de ancoragem, as quais podem estar ausentes ou em número reduzido, irreconhecíveis ou malformadas. Esse achado tanto em humanos (EADY et al, 1994) como em animais domésticos (BRUCKNER-TUDERMAN et al, 1991; NAGATA et al, 1995; OLIVRY et al, 1999a) direcionou os estudos para a identificação dos distúrbios genéticos relacionados com alterações no colágeno VII. Isso possibilitou a identificação de mutações no gene COL7A1 (que codifica o colágeno VII) em famílias com EB Distrófica dominante ou recessiva (MARINKOVICH, 1995; WEEDON, 1997).

Outras doenças com marcadores ultraestruturais importantes incluem o Eritroderma Ictiosiforme Bolhoso Congênito, que se caracteriza principalmente por aglomerados bem demarcados e finamente filamentosos de queratina nas células suprabasais. É provável que a doença esteja relacionada com a produção inadequada de filagrina. No

QPH tipo Voerner verificam-se os mesmos aglomerados de queratina do Eritroderma, embora eles ocorram em maior quantidade. Alterações nos grânulos de querato-hialina também são encontrados. A doença está relacionada com mutações no gene para a citoqueratina 9, que se encontra no cromossomo 17 humano. Num outro tipo de QPH foram encontrados tonotúbulos, ou seja, queratina sintetizada numa conformação tubular anormal (ANTON-LAMPRECHT, 1994).

O estudo ultraestrutural da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah definiu que nessa doença a principal característica ultraestrutural é a fenda suprabasal. Isso demonstra que a doença difere completamente das EBs clássicas (simples, juncional ou distrófica). Além disso, não foram encontradas alterações primárias nos filamentos intermediários de queratina, seja nos queratinócitos basais ou suprabasais.

Esses achados direcionam para a pesquisa de distúrbios nos desmossomos ao invés de alterações na JDE (como as que ocorrem nas EBs) ou nos filamentos intermediários, e são um modelo para a comparação com outras doenças que cursam com a perda de coesão entre os queratinócitos suprabasais.

Dentre as doenças a serem comparadas devem ser incluídas doenças auto-imunes como os Pênfigos, especialmente o Pênfigo Vulgar e doenças hereditárias como a Doença de Darier e de Hailey-Hailey, a Acantólise Familiar dos Bovinos Angus e a Síndrome de Displasia Ectodérmica/Fragilidade Epidérmica, recentemente caracterizada.

A diferenciação do PV e da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah deve considerar os achados de IFD e as características clínicas. Apesar disso, a comparação dos achados de MET deve ser feita, uma vez que as duas doenças compartilham características ultraestruturais. A principal delas é o aspecto geral da lesão, ou seja, a presença da fenda suprabasal, com os queratinócitos basais aderidos à derme e parcialmente separados nas suas faces laterais. Além disso, as células acantóticas ocorrem em ambas as doenças. A principal diferença reside no fato de que no PV parece que a condensação dos tonofilamentos e seu desprendimento dos desmossomos precede a desintegração dos mesmos (LEVER, 1979). Na Genodermatose Mecanobolhosa os tonofilamentos se mantêm unidos aos desmossomos, mesmo após a perda de coesão entre as células e a separação, quando ocorre, parece ser um evento secundário à perda da adesão entre os queratinócitos.

Alterações na Doença de Darier envolvem a formação de material disqueratótico, dissolução dos tonofilamentos, sua aglutinação na região perinuclear ou ainda o desaparecimento do núcleo e a queratinização defeituosa no citoplasma (grânulos e corpos redondos) (SCHANNE et al, 1985; SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992). Esse padrão de lesões não ocorre na Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah.

Apesar das diferenças clínico-patológicas e de herdabilidade, existem várias semelhanças ultraestruturais entre a Doença de Hailey-Hailey e a Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah. Em ambas, as células basais apresentam alguma redução no grau de adesão das suas superfícies laterais e apicais, mas a superfície basal mantém sua capacidade de adesão através dos hemidesmossomos normais (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970). Nas duas doenças são observadas as numerosas projeções filamentosas bizarras que se assemelham a microvilos (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970; SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992), e cujo aparecimento pode preceder o aumento dos espaços intercelulares (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970).

Embora na Doença de Hailey-Hailey seja freqüente o desaparecimento dos complexos desmossomos-tonofilamentos (GÖTTLIEB & LUTZNER, 1970), na Genodermatose Mecanobolhosa ocorre somente diminuição ou desaparecimento dos desmossomos (SHANLEY & GOLDSCHMIDT, 1992). Chama-se atenção para o fato de que a acantólise é muito mais intensa na Doença de Hailey-Hailey, que se caracteriza histologicamente pelo aspecto de muro dilapidado (SCHANNE et al, 1985). Na Genodermatose Mecanobolhosa células acantolíticas são observadas ocasionalmente no interior da fenda.

Por outro lado, somente na Doença de Hailey-Hailey os tonofilamentos retraídos formam agregados eletrodensos em torno do núcleo. Isso ocorre especialmente nas células acantolíticas, as quais podem apresentar também vacúolos preenchidos por material amorfo (GÖTTLIEB & LUTZNER, 1970; SCHANNE et al, 1985). No estrato granuloso, juntamente com os grânulos querato-hialinos, são observados aglomerados eletrodensos formando redemoinhos e que indicam queratinização anormal (GÖTTLIEB & LUTZNER, 1970). Na Genodermatose Mecanobolhosa não ocorre qualquer tipo de anormalidade de queratinização.

Embora a Acantólise Familiar dos Bovinos Angus, seja bastante semelhante à Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah, a diferença crucial reside no fato de que na primeira pode ocorrer separação entre os queratinócitos basais e a derme (JOLLY et al, 1973), o que nunca ocorre na Genodermatose Mecanobolhosa.

É interessante notar que na Síndrome de Displasia Ectodérmica/Fragilidade Epidérmica, que ocorre devido à ausência de uma proteína da placa desmossômica, os desmossomos ocorrem em número reduzido e cerca de 25% menores do que os desmossomos de peles controle e podem estar ausentes ou malformados. Há então, ampliação dos espaços intercelulares. A associação dos filamentos de queratina com a membrana celular está rompida. Os tonofilamentos dos queratinócitos suprabasais encontram-se condensados e compactados na região perinuclear e faltam as conexões com os desmossomos (McGRATH, 1999). A principal diferença em relação à Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah reside no fato de que nessa não há perda primária da associação entre os desmossomos e tonofilamentos.

Considerações Finais sobre a Etiopatogenia Da Genodermatose

Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah

O primeiro aspecto a ser comentado diz respeito à definição de que a Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah não é uma doença de caráter auto-imune. Embora aspectos clínicos e o caráter tipicamente hereditário da doença indicassem para essa direção, era necessário confirmar esse fato, já que os achados ultraestruturais demonstravam uma grande semelhança dessa doença especialmente com o Pênfigo Vulgar.

Uma vez descartado o caráter auto-imune da doença, os estudos foram direcionados para a avaliação comparativa de alguns aspectos da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah com outras doenças hereditárias que também cursam com falhas na coesão dos queratinócitos.

Acredita-se que o momento é oportuno para tecer alguns comentários sobre as dificuldades na obtenção de reagentes, especialmente de anticorpos poli ou monoclonais comerciais que sejam eficientes em estudos com tecidos de búfalos. Esses reagentes são escassos em Veterinária, mesmo para espécies de produção cujo interesse

econômico é alto, como aves, suínos e bovinos, ou ainda para espécies classicamente utilizadas em trabalhos experimentais, como ratos, camundongos e cobaias. A indisponibilidade ou ineficiência desses anticorpos para búfalos ficou clara nesse trabalho e, sem dúvida, dificultou maiores avanços no estudo.

De certa forma, um comentário semelhante pode ser feito no que diz respeito à escassez de literatura acerca de aspectos de fisiologia, histologia e sanidade dessa espécie.

Apesar das dificuldades acima relatadas, foi possível verificar que, como proposto por RIET-CORREA et al (1994), a doença tem um caráter único e embora compartilhe algumas semelhanças com outras doenças descritas em humanos ou animais domésticos ela não é idêntica e, portanto, não deve assumir a denominação de nenhuma delas.

Os resultados desse trabalho confirmam as suspeitas de RIET-CORREA et al (1994) de que a doença se deve exclusivamente a distúrbios nos complexos de junção célula-célula, muito provavelmente nos desmossomos, e não nas junções célula-matriz.

Além disso, indicam fortemente que a Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah deva ser causada mais especificamente por alterações que envolvem as caderinas desmossômicas e não as proteínas que constituem a placa dos desmossomos. Afirma-se isso, ao comparar-se os resultados obtidos nesse trabalho com os achados de MET e imuno-histoquímica de doenças hereditárias cujo defeito molecular já foi determinado e que ocorrem devido a alterações nessas diferentes regiões do desmossomo. Dentre elas destacam-se as doenças de Darier e de Hailey-Hailey que são causadas por mutações nas bombas de cálcio, nos genes gene ATP2A2 do cromossomo 12q23-24.1 humano (SAKUNTABHAI et al, 1999a) e ATP2C1 do cromossomo 3q21 humano (HU et al, 2000; SUDBRAK et al, 2000), respectivamente. Em função disso ocorrem alterações nas caderinas desmossômicas, que são cálcio-dependentes, e conseqüentemente há o desprendimento dos queratinócitos e fragilidade da epiderme (MISSIAEN et al, 2000). Além dessas, faz-se referência à Síndrome de Displasia Ectodérmica/Fragilidade Epidérmica, que é reconhecidamente causada por uma alteração na placa desmossômica, qual seja a falta de placofilina-1 (McGRATH, 1999; WHITTOCK et al, 2000).

Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão indicam que, assim como o que foi inicialmente definido para a doença de Hailey-Hailey, na Genodermatose Mecanobolhosa, a perda da adesão célula-célula precede a retração dos tonofilamentos, o que sugere que é a ligação entre as duas metades dos desmossomos, ou as estruturas responsáveis por essa adesão, que estão defeituosas (GOTTLIEB & LUTZNER, 1970; COOLEY et al, 1996).

Já na Síndrome de Displasia Ectodérmica/Fragilidade Epidérmica a separação entre tonofilamentos e desmossomos precede a perda de coesão das células. Os desmossomos, mesmo da pele sem lesão são rudimentares e ocorrem em menor quantidade (McGRATH, 1999).

Os achados de MET ficam mais consistentes se aliados aos resultados da imuno-histoquímica para desmoplaquininas I e II obtidos nesse trabalho. Verificou-se que mesmo nas lesões mais extensas, não houve variação no padrão de expressão das desmoplaquininas I e II. Elas mantiveram sua marcação restrita à periferia celular, tanto nas células do teto como nas do assoalho da fenda. A exceção foi feita às células

acantolíticas, o que deve se tratar de uma alteração secundária à perda primária de coesão das células.

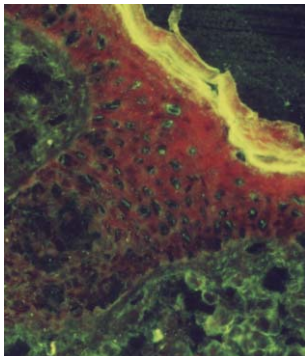
Nas amostras de pele perilesão e de lesão das doenças de Darier e Hailey-Hailey as diferentes proteínas desmossômicas também ficaram restritas à periferia celular (BURGE & GARROD, 1991; BURGE & SCHOMBERG, 1992; TADA & HASHIMOTO, 1998; HAKUNO et al, 2000). Por outro lado, na Síndrome de Displasia Ectodérmica/Fragilidade Epidérmica houve dispersão de desmoplaquininas no citoplasma das células do teto e assoalho da fenda (McGRATH, 1999; WHITTOCK et al, 2000).

Para corroborar as afirmações feitas, tem-se ainda um estudo em camundongos que tiveram o gene *DSG3*, que codifica a desmogleína 3, alterado. Quando esses animais eram heterozigotos para a mutação, não havia qualquer sinal clínico de lesão. Por outro lado, os camundongos heterozigotos apresentaram fragilidade do epitélio da mucosa esofágica e da pele. As lesões eram secundárias a traumatismos triviais. Havia desprendimento da mucosa esofágica quando os animais se alimentavam, e ocorriam lesões na face dos filhotes quando eles mamavam na mãe. Na histologia foi detectada a formação de fenda suprabasal. Pela microscopia eletrônica foi percebido o desprendimento das faces laterais dos queratinócitos basais. Nas superfícies celulares que perderam a coesão foram encontrados tonofilamentos ainda aderidos a metades de desmossomos. Esses achados são semelhantes às lesões do PV e são quase idênticos aos descritos para a Genodermatose mecanobolhosa dos Búfalos Murrah, à exceção de envolverem também as mucosas (KOCH et al, 1997; LENOX et al, 2000).

Por outro lado, camundongos *knockout* somente para caderina-P não apresentaram qualquer alteração. Os animais *knockout* para caderina-P e desmogleína 3 apresentaram lesões orais mais exuberantes que os mutantes somente para desmogleína 3. Devido a isso, a maioria dos camundongos morria de desnutrição durante a primeira semana pós-natal. Esse estudo em camundongos duplo *knockout* evidenciou que deve haver um sinergismo entre uma caderina clássica e uma desmossômica para manter a coesão dos queratinócitos (LENOX et al, 2000).

Tendo em vista os resultados do presente estudo, comparados com os achados de outras doenças cuja alteração molecular é conhecida e os achados em animais de laboratório geneticamente manipulados, pode-se inferir que a perda de coesão entre os queratinócitos na Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah se deve provavelmente a alterações qualitativas ou quantitativas nas caderinas desmossômicas e não nas proteínas que compõem a placa do desmossomo.

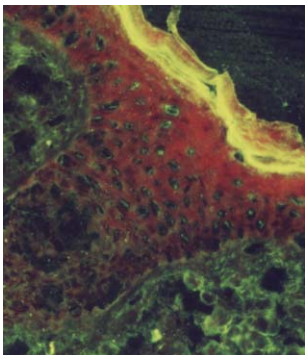
Conclusões



CONCLUSÕES

-
- ❖ A Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah tem caráter único. Embora a doença compartilhe semelhanças não se iguala a nenhuma outra descrita até o momento em humanos ou animais domésticos.
 - ❖ A ausência de imunofluorescência para auto-anticorpos da classe IgG e frações C1 e C3 do complemento em todas as amostras de pele, normal ou lesada, de búfalos portadores da Genodermatose Mecanobolhosa ou sadios pertencentes ao rebanho experimental, revela claramente que a doença não tem caráter auto-imune.
 - ❖ A doença é determinada por alterações nos complexo de junção célula-célula. As alterações devem ocorrer nas estruturas desmossômicas.
 - ❖ Através desse estudo obtiveram-se fortes indicativos de que a patogenia da Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah envolve alterações na estrutura e/ou estabilidade e funcionamento das caderinas desmossômicas.
 - ❖ É provável que a placa desmossômica não apresente alterações primárias na Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah.

Referências Bibliográficas



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON J. D. *Molecular Biology of the Cell*. 3. ed. London: Garland, 1994. 1294 p.
- ANHALT, G. J. Making sense of antigens and antibodies in pemphigus (editorial). *J. Amer. Acad. Dermatol.*, v. 40, p. 763, 766, 1999.
- ANTON-LAMPRECHT, I. Ultrastructural identification of basic abnormalities as clues to genetic disorders of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, v. 103, p. 6s-12s, 1994.
- BATIFORA, H. Immunohistochemistry vs. molecular biology: wich tool for diagnostic pathology. *Molec. Pathol.*, v. 12, p.167-186, 1991.
- BLACK, M. M., THOMAS, R. H. M., BHOGAL, B. The value of immunofluorescence techniques in the diagnosis of bullous disorders: a review. *Clin. Exp. Dermatol.*, v. 8, p. 337-353, 1983.
- BORRADORI, L., SONNENBERG, A. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Cur. Opin. Cell Biol.*, v. 8, p. 647-656, 1996.
- BRADLEY, G. A., MAYS, M. B. C. Immunoperoxidase staining for the detection of autoantibodies in canine autoimmune skin disease; comparision to immunofluorescence results. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 26, p. 105-113, 1990.
- BRENNEMAN, K. A., OLIVRY, T., DORMAN, D. C. Rudimentary hemidesmosome formation in congenital generalized junctional epidermolysis bullosa in the Sprague-Dawley rat. *Vet. Pathol.*, v. 37, p. 336-339, 2000.
- BRUCKNER-TUDERMAN, L. GUSCETTI, F., EHRENSPERGER, F. Animal model for dermolytic mechanobullous disease: sheep with recessive dystrophic epidermolysis bullosa lack collagen VII. *J. Invest. Dermatol.*, v. 96, p. 452-458, 1991.
- BURGE, S. M., GARROD, D. R. An immunohistological study of desmosomes in Darier's disease and Hailey-Hailey disease. *Br. J. Dermatol.*, v. 124, p. 242-251, 1991.
- BURGE, S. M., SCHOMBERG, K. H. Adhesion molecules and related proteins in Darier's disease and Hailey-Hailey disease. *Br. J. Dermatol.*, v. 127, p. 335-343, 1992.
- BURGESON, R. E., CHRISTIANO, A. M. The dermal-epidermal junction. *Cur. Opin. Cell Biol.*, v. 9, p. 651-658, 1997.
- CARLOTTI, D. Autoimmune mediated skin diseases. *J. Small An. Prac.*, v. 30, p. 223-227, 1989.
- COOLEY, J. E., BRIGGAMAN, R. A., CRONCE, D. J., BANES, A. J., O'KEEFE, E. J. Hailey-Hailey disease keratinocytes: normal assembly of cell-cell junctions in vitro. *J. Invest. Dermatol.*, v. 107, n. 6, p. 877-881, 1996.
- COWIN, P., KAPPRELL, H., FRANKE, W. W. The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types. *J. Cell Biol.*, v. 11, p. 1442-1454, 1985.
- COZZANI, E., CACCIAPUOTI, M., PARODI, A., GHOHESTANI, R., REBORA, A. Desmosomes and their autoimmune pathologies. *Eur. J. Dermatol.*, v. 10, p. 255-261, 2000.
- CRAFT, J., FATENEJAD, S. Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity. *Arthritis Rheumatism.*, v. 40, p. 1374-1382, 1997.

- CROSS, P.C., MERCER, K. L. Skin. In: _____. *Cell and tissue ultra structure*. New York: W. H. Freeman, 1993. p. 244-256.
- CURTAIN, C. C., FUDENBERG, H. H. Evolution of the immunoglobulin antigens in the ruminantia. *Biochem. Genet.*, v. 8, n. 3, p. 301-308, 1973.
- DOHERTY, M.J., RUSSO, G.G., JOLLY, H.W., STEWART, K.R. Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *J. Am. Acad. Dermatopathol.*, v. 20, n. 5, p. 827-837, 1989.
- DUNSTAN, R. W., SILLS, R. C., WILKINSON, J. E., PALLER, A. S., HASHIMOTO, K. H. A disease resembling junctional epidermolysis bullosa in a toy poodle. *Am. J. Dermatopathol.*, v. 10, n. 5, p. 442-447, 1988.
- EADY, R. A. J., McGRATH, J. A., McMILLAN, J. R. Ultrastructural clues to genetic disorders of skin: the dermal-epidermal junction. *J. Invest. Dermatol.*, v. 103, p. 13s-18s, 1994.
- ELDER, D. E., ELENITSAS, R., JAWORSKY, C., JOHNSON, B. L., Jr. *Lever's histopathology of the skin*. 8.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997. 1073 p.
- FERNANDES, C. G., DAMÉ, M. C. F., RIET-CORREA, F. Dermatose em búfalos. Dermatose hereditária de pele que precisa ser controlada. *Com. Téc. EMBRAPA*, n. 2, p. 1-4, 1996.
- FINE, J.-D., BRIGGAMAN, R. A., GAMMON, W. R. Laboratory approach to the evaluation of vesiculobullous disorders. In: FINE, J.-D. *Topics in clinical dermatology. Bullous Diseases*. Nova York: Iagaku-Shoin, 1993, p. 1-22.
- FUCHS, E., DOWLING, J., SEGRE, J., LO S. H., YU Q. Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins. *Cur. Opin. Genet. Dev.*, v. 7, p. 672-682, 1997.
- GALLICANO, G. I., KOUKLIS, P., BAUER, C., YIN, M., VASIOUKHIN, V., DAGENSTEIN, L., FUCHS, E. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J. Cell Biol.*, v. 143, n. 7, p. 2009-2022, 1998.
- GOTTLIEB, S. K., LUTZNER, M. A. Hailey-Hailey disease - an electron microscopic study. *J. Invest. Dermatol.*, v. 54, n. 5, p. 368-376, 1970.
- GROSS, T. L., IHRKE, P. J., WALDER, E. J. *Veterinary dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease*. St. Louis: Mosby, 1992. 520p.
- HAFTEK, M., KOWALEWSKI, C., MESNIL, M., BLASZCZYK, M., SCHMITT, D. Internalization of gap junctions in benign familial pemphigus (Hailey-Hailey disease) and keratosis follicularis (Darier's disease). *Br. J. Dermatol.*, v. 141, n. 2, p. 224-230, 1999.
- HAKUNO, M., SHIMIZU, H., AKIYAMA, M., AMAGAI, M., WAHL, J. K., WHEELOCK, M. J., NISHIKAWA, T. Dissociation of intra- and extracellular

- domains of desmosomal cadherins and E-cadherin in Hailey-Hailey disease and Darier's disease. *Br. J. Dermatol.*, v. 142, n. 4, p. 702-711, 2000.
- HASHIMOTO, K., LEVER, W. F. An ultrastructural study of cell junctions in pemphigus vulgaris. *Arch. Dermatol.*, v. 101, p. 287-298, 1970.
- HASHIMOTO, T., EBIHARA, T., NISHIKAWA, T. Two different isoforms of desmocollin are recognized by antibodies in various types of pemphigus. *Dermatology*, v. 189, p. 124-125, 1994.
- HENNING, D., NIELSEN, K. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulins of other species. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulins of other species, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 34, p. 235-243, 1992.
- HERRMANN, H., AEBI, U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 12, p. 79-80, 2000.
- HERTL, M. Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 122, p. 91-100, 2000.
- HU, Z., BONIFAS, J. M., BEECH, J., BENCH, G., SHIGIHARA, T., OGAWA, H., IKEDA, S., MAURO, T., EPSTEIN, E. H. Jr. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat. Genet.*, v. 24, n. 1, p. 61-65, 2000.
- JOHNSON, G. C., KOHN, C. W., JOHNSON, C. W., GARRY, F., SCOTT, D., MARTIN, S. Ultrastructure of junctional epidermolysis bullosa in belgian foal. *J. Comp. Pathol.*, v. 98, p. 329-336, 1988.
- JOLLY, R. D. Lysosomal storage diseases in livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, n. 9, v. 1, p. 41-53, 1993.
- JOLLY, R.D., ALLEY, M. R., O'HARA, P. J. O. Familial acantholysis of angus calves. *Vet. Pathol.*, v. 10, p. 473-483, 1973.
- JORDON, R. E., KAWANA, S., FRITZ, K. A. Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.*, v. 85, s. 1, p. 72s-78s, 1985.
- KELSELL, D. P., STEVENS, H. P. The palmoplantar keratodermas: much more than palms and soles. *Mol. Med. Today*, v. march, p. 107-113, 1999.
- KERSTING, E., GOEBELER, M., HAMM, H., ROSE, Ch., ZILLIKENS, D., BRÖCKER, E.-B. Subepidermal blasenbildende autoimmunodermatose mit linearen Ablagerungen von IgA und IgG. *Der Hautarzt*. V. 51, n. 5, p. 340-344, 2000.
- KOCH, P.J., MAHONEY, M.G., ISHIKAWA, H., PULKKINEN, L., UITTO, J., SCHULTZ, L., MURPHY, G.F., WHITAKER-MENEZES, D., STANLEY, J.R. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J. Cell Biol.*, v. 137, n. 5, 1997.
- KOWALCZYK, A. P, BORNSLAEGER, E. A., BORGWARDT, J. E., PALKA, H. L., DHALIVAL, A. S., CORCORAN, C. M., DENNING, M. F., GREEN, K. J. The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters

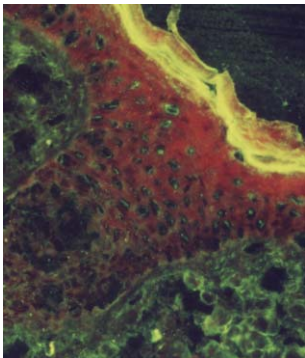
- desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J. Cell Biol.*, v. 139, n. 3, p. 773-784, 1997.
- KOWALCZYK, A. P., HATZFELD, M., BORNSLAEGER, E. A., KOPP, D. S., BORGWARDT, J. E., CORCORAN, C. M., SETTLER, A., GREEN, K. J. The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 26, p. 18145-18148, 1999.
- LENOX, J. M., KOCH, P. J., MAHONEY, M.G., LIEBERMAN, M., STANLEY, J. R., RADICE, G. L. Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein 3 double knockout mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecules in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia. *J. Invest. Dermatol.*, v. 114, p. 948-952, 2000.
- LEVER, W. F. Pemphigus and pemphigoid. *J. Am. Acad. Derm.*, v. 1, n. 1, p. 2-31, 1979.
- LEWIS, J. E., WAHL III, J. K., SASS, K. M., JENSEN, P. J., JOHNSON, K. R., WHEELOCK, M. J. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J. Cell Biol.*, v. 136, n. 4, p. 919-934, 1997.
- LIN, M.-S., MASCARO Jr., J. M., LIU, Z., ESPAÑA, A., DIAZ, L. A. The desmosome and hemidesmosome in cutaneous autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 107, s. 1, p. 9-15, 1997.
- MARCOZZI, C., BURDETT, I. D. J., BUXTON, R. S., MAGEE, A. I. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J. Cell Sci.*, v. 111, n. 4, p. 495-509, 1998.
- MARINKOVICH, M. P. Blistering diseases. In: Desconhecido. The Eletronic Textbook of dermatology. The Internet Dermatology Society, p. 1-26, 1995.
- McGRATH, J. A. Hereditary diseases of desmosomes. *J. Dermatol. Sci.*, v. 20 jan., p. 85-91, 1999.
- McGRATH, J.A., KIVIRIKKO, S., CIATTI, S., MOSS, C., CHRISTIANO, A.M., UITTO, J. A recurrent homozygous nonsense mutation within the LAMA3 gene as a cause of Herlitz junctional epidermolysis bullosa in patients of pakistani ancestry: evidence for a founder effect. *J. Invest. Dermatol.*, v. 104, n. 4, p. 781-784, 1996.
- MILS, V., VINCENT, C., CROUTE, F., SERRE, G. The expression of desmosomal and corneodesmosomal antigens show specific variations during the terminal differentiation of epidermis and hair follicle epithelia. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 40, n. 9, p. 1329-1337, 1992.
- MISSIAEN, L., ROBBERRECHT, W., VAN DEN BOSCH, L., CALLEWAERT, G., PARYS, J. B., WUYTACK, F., RAEYMAEKERS, L., NILIUS, B., EGGERMONT, J., DE SMEDT, H. Abnormal intracellular Ca⁺⁺ homeostasis and disease. *Cell Calcium*, v. 28, n. 1, p. 1-21, 2000.
- MUSETTE, P., JOLY, P., GILBERT, D., MARINHO, E., CRICKX, B., TRON, F., BELAICH, S., DESCAMPS, V. A paraneoplastic mixed bullous skin disease: breakdown in tolerance to multiple epidermal antigens. *Br. J. Dermatol.*, v. 143, p. 149-153, 2000.

- NAGATA, M., SHIMIZU, H., MASUNAGA, T., NISHIKAWA, T., NANKO, H., KARIYA, K., WASHIZU, T., ISHIDA, T. Dystrophic form of inherited epidermolysis bullosa in a dog (Akita Inu). *Br. J. Dermatol.*, v. 133, p. 1000-1004, 1995.
- NEOH, S.H., JAHODA, D.M., ROWE, D.S., VOLLER, A. Immunoglobulin classes in mammalian species identified by cross-reactivity with antisera to human immunoglobulin. *Immunochem.*, v. 10, n. 12, p. 805-813, 1973.
- NICOLAS, J.F., STAQUET, M.J. Molécules de l'adhérence cellulaire et pathologie cutanée. *Ann. Dermatol. Vénereol.*, v.122, p. 50-57,1995.
- NORTH, A. J., CHIDGEY, M. A. J., CLARKE, J. P., BARDSLEY, W. G., GARROD, D. R. Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine nasal epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 7701-7705, 1996.
- NORTH, A. J., BARDSLEY, W. G., HYAM, J., BORNSLAEGER, E. A., CORDINGLEY, H. C., TRINNAMAN, B., HATZFELD, M., GREEN, K. J., MAGEE, A. I., GARROD, D. R. Molecular map of the desmosomal plaque. *J. Cell Sci.*, v. 112, n. 23, p. 4325-4336, 1999.
- OLIVRY, T., DUNSTON, S. M., MARINKOVICH, M. P. Reduced anchoring fibril formation and collagen VII immunoreactivity in feline dystrophic epidermolysis bullosa. *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 616-618, 1999a.
- OLIVRY, T., CHAN, L. S., XU, L., CHACE, P., DUNSTON, S. M., FAHEY, M., MARINKOVICH, M. P. Novel feline autoimmune blistering disease resembling bullous pemphigoid in humans: IgG autoantibodies target the NC16A ectodomain of type XVII collagen (BP180/BPAG2). *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 328-335, 1999b.
- OLIVRY, T., MIRSKY, M. L., SINGLETON, W., DUNSTON, S. M., BORRILLO, A. K. G., XU, L., TRACZYK, T., ROSOLIA, D. L., CHAN, L. A spontaneously arising porcine model of bullous pemphigoid. *Arch. Dermatol. Res.*, v. 292, p. 37-45, 2000.
- RIET-CORREA, F., BARROS, S. S., DAMÉ, M. C., PEIXOTO, P. V. Hereditary suprabasilar acantholytic mechanobullous dermatosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet. Pathol.*, v. 31, p. 450-454, 1994.
- SAKUNTABHAI, A., RUIZ-PEREZ, V., CARTER, S., JACOBSEN, N., BURGE, S., MONK, S., SMITH, M., MUNRO, C. S., O'DONOVAN, M., CRADDOCK, N., KUCHERLAPATI, R., REES, J. L., OWEN, M., LATHROP, G. M., MONACO, A. P., STRACHAN, T., HOVNANIAN, A. Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat Genet.*, v.21, n. 3, p. 271-277, 1999a.
- SAKUNTABHAI, A., BURGE, S., MONK, S., HOVNANIAN, A. Spectrum of novel ATP2A2 mutations in patients with Darier's disease. *Hum. Mol. Genet.*, v. 8, n. 9, p. 1611-1619, 1999b.

- SCHANNE, R., BURG, G., BRAUN-FALCO, O. Zur nosologischen beziehung des dyskeratosis follicularis (Darier) und des Pemphigus benignus chronicus familiaris (Hailey-Hailey). *Hautartz*, v. 36, p. 504-508, 1985.
- SCOTT, D. W. Autoimmune skin diseases in the horse. *Equine Pract.*, v. 11, n. 10, p.20-32, 1989.
- SCOTT, D. W., WOLFE, M. J., SMITH, C. A., LEWIS, R. M. The comparative pathology of non-viral bullous skin diseases in domestic animals. *Vet. Path.*, v. 17, p. 257-281, 1980.
- SHANLEY, K.J., GOLDSCHMIDT, M.H. Canine benign familial chronic pemphigus (Hailey-Hailey disease). In: SECOND WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 1992, Montreal. *Proceedings...* Montreal. p. 147-159.
- SHINYA, K., NOMURA, K., WADA, S., MORIOKA, H., UEMURA, T. Pemphigus foliaceus with typical histological and immunopathological findings in a dog. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 8, p. 815-817, 1996.
- SMITH, E. A., FUCHS, E. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J. Cell Biol.*, v. 141, n. 5, p. 1229-1241, 1998.
- SUDBRAK, R., BROWN, J., DOBSON-STONE, C., CARTER, S., RAMSER, J., WHITE, J., HEALY, E., DISSANAYAKE, M., LARREGUE, M., PERRUSSEL, M., LEHRACH, H., MUNRO, C. S., STRACHAN, T., BURGE, S., HOVNANIAN, A., MONACO, A. P. Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Hum. Mol. Genet.*, v. 9, n. 7, p.1131-1140, 2000.
- SUEKI, H., SHANLEY, K., GOLDSCHMIDT, M. H., LAZARUS, G. S., MURPHY, G. F. Dominantly inherited epidermal acantholysis in dogs, simulating human benign familial chronic pemphigus (Hailey-Hailey disease). *Br. J. Dermatol.*, v. 136, n. 2, p. 190-196, 1997.
- SUTER, M. M., BRUIN, A. de, WYDER, M., WURM, S., CREDILLE, K., CRAMERI, F., MÜLLER, E. Autoimmune diseases of domestic animals: an update. In: KWOCHKA, K. W., WILLEMSE, T., TSCHARNER, C. von. *Advances in Veterinary Dermatology*. Oxford: Butterworth Heinemann, 1998, p. 321-337.
- TADA, J., HASHIMOTO, K. Ultrastructural localization of cell junctional components (desmoglein, plakoglobin, E-cadherin, and beta-catenin) in Hailey-Hailey disease, Darier's disease, and pemphigus vulgaris. *J. Cutan. Pathol.*, v. 25, n. 2, p. 106-115, 1998.
- THOMPSON, M. W., McINNES, R. R., WILLARD, H. F. Thompson & Thompson Genética. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991. 339 p.
- TROYANOVSKY, S. M. Mechanisms of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 11, p. 561-566, 1999.
- WEEDON D. The vesicobullous reaction pattern. In: _____. *Skin Pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1997. p. 109-159.

-
- WHITTOCK, N. V., HAFTEK, M., ANGOULVANT, N. WOLF, F., PERROT, H., EADY, R. A. J., McGRATH, J.A. Genomic amplification of the human placofilin 1 gene and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *J. Invest. Dermatol.*, v. 115, p. 368-374, 2000.
- WITCHER, L. L., COLLINS, R., PUTTAGUNTA, S., MECHANIC, S. E., MUNSONS, M., GUMBINER, B., COWIN, P. Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 18, p. 10904-10909, 1996.

Anexos



ANEXOS

Anexo A - Produção do Conjugado de Anti-IgG de Búfalo

1. Processamento de Sangue para Obtenção do Soro

- ◆ Manter o sangue a 37°C em banho Maria por 25 min.
- ◆ Manter o sangue na geladeira por 20 min.
- ◆ Centrifugar a 3000rpm por 5 min.
- ◆ Manter o sangue em geladeira por 24 h.

2. Purificação de IgG com Proteína A

2.1. SOLUÇÕES

2.1.1.1. Tampão Fosfato pH 8,0

Tamponar solução A com solução B até pH 8,0.

2.1.1.2. Sol. A: Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4) 0,1M

Peso molecular do $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 141,96$

Exemplo de preparo de 1 litro da solução 0,1M:

1 litro = 14,19g Na_2HPO_4 + H₂O destilada q.s.p. 1litro

2.1.1.3. Sol. B: Fosfato de Sódio Monobásico (NaH_2PO_4) 0,1M

Peso molecular do $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 137,99$

Exemplo de preparo de 1 litro da solução 0,1M:

1 litro = 13,79g NaH_2PO_4 + H₂O destilada q.s.p. 1litro

2.1.2. Tampão citrato-fosfato pH 2,2

Tamponar solução A com solução B até pH 2,2.

2.1.2.1. Sol. A: Ácido Cítrico 0,1M

Peso molecular do Ácido Cítrico: 192,13

Exemplo de preparo de 100ml da solução 0,1M: 100ml = 1,92 ácido cítrico + H₂O destilada q.s.p. 100 ml

2.1.2.2. Sol. B: Fosfato de Sódio Monobásico (NaH_2PO_4) 0,1M

Peso molecular do $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 137,99$

Exemplo de preparo de 1 litro da solução 0,1M: 1 litro = 13,79g NaH_2PO_4 + H₂O destilada q.s.p. 1litro

2.2. MÉTODO

- ◆ Dialisar 4ml do soro a ser purificado em tampão fosfato 0,1M pH8,0.
 - ◆ Equilibrar coluna de proteína A com tampão fosfato 0,1M pH8,0.
 - ◆ Adicionar soro na coluna.
 - ◆ Zerar proteína.
 - ◆ Adicionar tampão citrato-fosfato 0,1M pH2,2.
 - ◆ Recolher as frações correspondentes aos picos de proteína após adicionar o citrato-fosfato 0,1M pH2,2.
 - ◆ Medir quantidade de proteína por espectrofotometria.
- Coeficiente de absorvância da IgG: 1,35.

3. Precipitação de IGG com Sulfato de Amônio

3.1. SOLUÇÕES

3.1.1. Solução Saturada de Sulfato de Amônio pH 7,0

Sulfato de Amônio ----- 76g
 H₂O destilada ----- q.s.p. 1 litro

Titular com HCl 1N até obter pH 7,0.

3.1.2. Solução Salina 0,85%

NaCl ----- 8,5g
H₂O destilada ----- q.s.p. 1 litro

3.1.3. PBS (0,01M - pH 7,2)

NaH₂PO₄.H₂O ----- 1,37g
NaCl ----- 0,57g
H₂O destilada ----- q.s.p. 1 litro

Dissolver o NaH₂PO₄.H₂O e o NaCl em 900ml de H₂O destilada.

Titular com NaOH 1N até obter pH 7,2.

Completar com H₂O destilada até obter 1 litro de solução

3.2. MÉTODO

- ◆ Determinar o volume de soro a ser precipitado
- ◆ Adicionar lentamente e sob agitação o volume equivalente de Solução Saturada de Sulfato de Amônio pH 7,0.
- ◆ Deixar overnight
- ◆ Centrifugar o precipitado
5010rpm (3000rg) / 30 minutos
- ◆ Resuspender o precipitado em 2ml de Solução Salina 0,85%
- ◆ Dialisar contra 2 litros de Solução Salina 0,85% (período?)
- ◆ Dialisar contra 2 litros de PBS
- ◆ Verificar a quantidade de proteína do produto diluído 1:100, por espectrofotometria.

4. Obtenção de Soro Anti-IgG em Coelhos

- ◆ Realizar 3 aplicações de 2ml da solução IgG+Adjuvante no dorso do pescoço do coelho. Após colhe-se o sangue dos animais. Utiliza-se esquema apresentado no (Quadro 9).

Quadro 9 - Esquema de imunização de coelhos para obtenção de anti-imunoglobulina

Aplicação	Intervalo	Observação
1ª aplicação	1º dia	1ml* de imunoglobulina purificada (IgG) + 1ml de adjuvante <u>completo</u> de Freund
2ª aplicação	15º dia	1ml de imunoglobulina purificada (IgG) + 1ml de adjuvante <u>incompleto</u> de Freund
3ª aplicação	21º dia	1ml de imunoglobulina purificada (IgG) + 1ml de adjuvante <u>incompleto</u> de Freund
Colheita do sangue	28º dia	Punção intracardiaca ou exangüinação

*Cada ml de imunoglobulina deve conter aproximadamente 1mg de IgG.

- ◆ Purificar IgG com proteína A : conforme descrito no item 2.
- ◆ Precipitar com sulfato de amônio: conforme descrito no item 3.
- ◆ Medir proteína por espectrofotometria: absorbância da IgG: 1,35.

5. Teste de Imunodifusão em Ágar-Gel

5.1. SOLUÇÕES

5.1.1. Tampão Borato pH 8,3

Ácido Bórico	0,186g
KCl	0,725g
Mertiolate	0,01%
H ₂ O destilada	95ml

Titular a solução até pH 8,3 com NaOH 0,2N

Completar o volume com H₂O destilada até 100ml.

5.1.2. Solução Salina 0,85% - ver ítem 3.1.2

5.2. PREPARO DO GEL

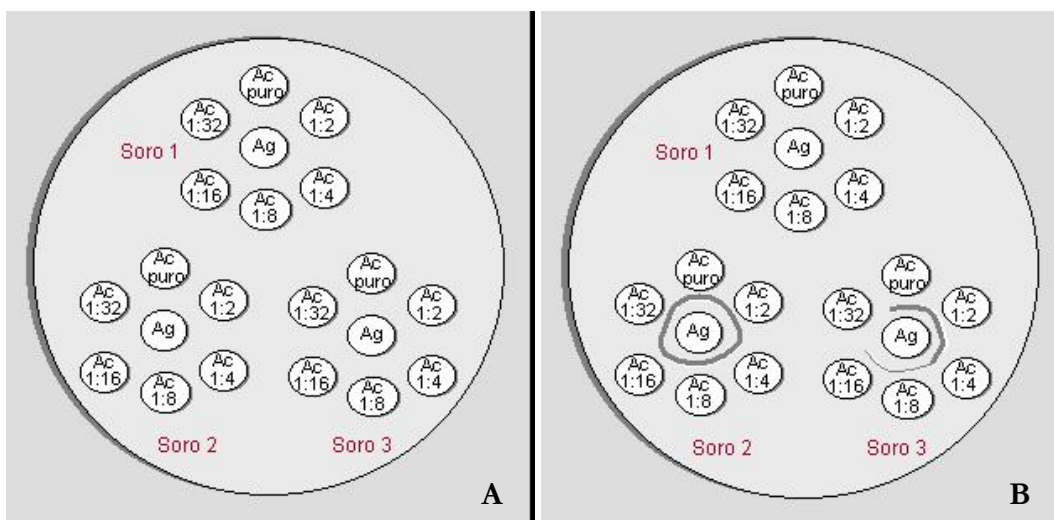
Tampão Borato pH 8,3	1,25ml
Agarose	0,2g
Solução Salina 0,85%	23,5ml

Dissolver no forno microondas. Usa-se cerca de 24ml/placa

5.3. MÉTODO

- ◆ Preparar a placa colocando o gel e fazendo os orifícios no gel.
- ◆ Distribuir os reagentes na placa conforme exemplo da Figura 36A.
- ◆ Avaliar o resultado: incubar e verificar linha de precipitação (Figura 36B) após 24 e 48 horas.

Figura 36 - Imunodifusão em ágar-gel. (A) Exemplo da distribuição do antígeno e



imunoglobulinas na placa para imunodifusão em ágar-gel. (B) Soro 1: negativo; Soro 2: positivo para todas as diluições; Soro 3: Houve linha de precipitação até diluição 1:16 embora as 2 últimas a linha seja tênue. Na diluição 1:32 não houve linha de precipitação.

6. Preparo do Conjugado de IgG e Isotiocianato de Fluoresceína (ITCFO)

6.1. PREPARO DA COLUNA DE SEPHADEX G-25

6.1.1. Resina

Sephadex G25	9g
PBS	85ml

Aquecer (90°C) 6g de Sephadex G25 com 50 ml de PBS em banho-Maria com agitação por 1 hora.
Adicionar mais 3g de Sephadex G25 e 35 ml de PBS e manter em banho Maria (90°C) com agitação por mais 1 hora.

Deixar decantar e preencher a coluna

6.2. SOLUÇÕES

6.2.1. Solução Salina 0,85% - ver item 3.1.2

6.2.2. PBS (0,01M - pH 7,2) - ver item 3.1.3

6.2.3. Solução Carbonato-Bicarbonato de Sódio (0,5M-pH 9,5)

Titular a Solução de Bicarbonato com a de Carbonato até pH 9,5.

6.2.3.1. Solução de Carbonato:

NaCO ₃ -----	7,15g
H ₂ O destilada -----	q.s.p. 50ml

6.2.3.2. Solução de Bicarbonato:

NaHCO ₃ -----	2,1g
H ₂ O destilada -----	q.s.p. 50ml

6.2.4. ITCFO

ITCFO -----	0,9mg
Tampão Carbonato-Bicarbonato-----	1,2ml
Solução Salina (gelada) -----	4,8ml

6.3. MÉTODO

- ◆ Adicionar 200µl de tampão Carbonato-bicarbonato em 1ml de solução de imunoglobulina (15-25mg/ml)
- ◆ Dialisar o produto contra ITCFO por 18h, 4°C, com agitação
- ◆ Dialisar o produto contra Solução Salina por 3h, 4°C, com agitação
- ◆ Dialisar o produto contra PBS *overnight*, 4°C, com agitação
- ◆ Cromatografia em coluna de resina Sephadex G25 ou G50

Colher as primeiras frações coradas.

A segunda leva de frações coradas se referem ao ITCFO não conjugado e devem ser desprezadas.

- ◆ Adicionar conservante (timerosal 1:50) ao conjugado obtido.

**Anexo B - Técnicas de Processamento para Avaliação das
Amostras Teciduais**

1. Imunofluorescência

2. Imuno-Histoquímica

3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

1. Teste de Imunofluorescência Direta

São utilizados cortes de congelação. O material pode estar acondicionado em Líquido de Michel (Meio de Transporte) ou congelado.

1.1. PROCEDIMENTO PARA ACONDICIONAR MATERIAL CONGELADO

- ◆ Colher a amostra evitando esmagar o tecido.
- ◆ Cortar a amostra em fragmentos pequenos: do tamanho e forma que serão submetidos ao corte no micrótomo.
- ◆ Acondicionar as amostras individualmente em papel alumínio com a menor umidade possível. Elas devem estar identificadas.
- ◆ Manter por 2-3 horas em nitrogênio líquido para permitir congelamento rápido e evitar a formação de cristais de gelo.
- ◆ Manter as amostras em freezer.

1.2. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

- ◆ Realizar os corte em micrótomo de congelação.

As lâminas devem estar limpas. Se lâminas histológicas simples forem utilizadas, é prático delimitar os cortes com esmalte de unhas, para evitar desperdício e mistura de reagentes.

- ◆ Incubar as lâminas em acetona por 10 minutos. A acetona pode ser usada até duas vezes.
- ◆ Retirar da acetona e secar as lâminas em temperatura ambiente.
- ◆ Lavar com PBS 2 vezes.
- ◆ Deixar de molho no PBS, após a última lavada.
- ◆ Retirar as lâminas, uma a uma do PBS e pingar o conjugado. Usa-se cerca de 100µl de conjugado por corte.
- ◆ Incubar por 30 minutos em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente.
- ◆ Descartar o conjugado. Não lavar.
- ◆ Secar as bordas da lâmina e pingar uma solução de:

PBS -----	100ml
Azul de Evans (sol 1:100) -----	10ml
Glicerina -----	2-3 gotas

- ◆ Cobrir com lamínula.

Os cortes mantêm a fluorescência por cerca de 6 meses se mantidos na geladeira.

2. Teste de Imuno-Histoquímica

Podem ser utilizados cortes de parafina ou de congelação.

2.1. REAGENTES

2.1.1. Cola para lâminas

Cola Cascorez Extra (rótulo azul) 1:3 em H ₂ O -----	40ml
Água -----	160ml
Poli-D-lisina -----	20mg

Mergulhar as lâminas na cola e deixa-las secando na estufa.

Usar a cola para no máximo 1000 lâminas.

Desprezar o restante da cola.

2.2. PREPARO DAS LÂMINAS

- ◆ Cortar os blocos (parafina ou congelação) e colocar os cortes nas lâminas preparadas previamente com a cola
- ◆ Riscar as lâminas em torno dos cortes com diamante.
- ◆ Identificar as lâminas de acordo com o mapa (Quadro 9).

Quadro 9 - Mapa exemplificando os dados de identificação de lâminas processadas por imuno-

histoquímica.

Nº	nº do material	Recuperação Ag +T / MOnd / PBS	Reagente primário	Reagente secundário
1	289/00	+T	DEP1:50	anti-mouse
2	Fígado	MOnd	AE1 1:100	anti-rabbit
3	P345/00	PBS	IgG 1:10	anti-mouse
n				

Abreviaturas: Ag: antígeno; +T: recuperação Antigênica com tripsina; MOnd: recuperação antigênica no forno de microondas.

2.3. PREPARAR OS CORTES

2.3.1. Cortes em parafina

Desparafinar como para a coloração de rotina (H-E) e incluir na bateria 1 cuba com PBS

Xilol-----	3 passagens de 5 minutos
Álcool absoluto-----	4 passagens
PBS-----	1 passagem de 5 minutos

2.3.2. Cortes de congelação

Cortes recém saídos do freezer tendem a cair da lâmina. Assim, no inverno deve-se deixar as lâminas com os cortes em temperatura ambiente por 3-4 horas. No verão as lâminas devem ficar na geladeira (não freezer) até pouco antes de iniciar a técnica.

2.4. INATIVAR A PEROXIDASE ENDÓGENA

- ◆ Colocar a água oxigenada conforme indicado a seguir:
 - Cortes em parafina

Transferir as lâminas dos berços para bandejas

Pingar água oxigenada 3% e deixar por 5 minutos

- Cortes de congelação

Transferir as lâminas dos berços para bandejas

Colocar as lâminas em solução de metanol:água oxigenada, preparada imediatamente antes do uso.

- ◆ Lavar com PBS. Pingar PBS nas lâminas para eu elas não sequem e deixa-las.

2.5. FAZER A RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA: UTILIZAR UM DOS SEGUINTE MÉTODOS DE

ACORDO COM A INDICAÇÃO DO CASO.

◆ Recuperação de epítomos com protease - método enzimático: Tripsina 0,25% diluída em PBS

- Retirar o PBS das lâminas com bomba de vácuo
- Pingar a Tripsina 0,25% nos cortes e incubar por 1 hora em temperatura ambiente.
- Lavar as lâminas com PBS e pingar PBS nos cortes

Obs.: A solução de Tripsina 0,25% em PBS deve ser mantida congelada e só deve ser retirada do freezer no momento que for utilizada.

- ◆ Recuperação de epítomos no forno de microondas

• Transferir as lâminas para cuba com berço e colocar a solução de tampão citrato (0,01M, pH 6,0)

- Usar o forno durante 15 minutos, em 4 ciclos (Quadro 10).

Quadro 10 - Ciclos no forno de microondas para recuperação antigênica.

Ciclo	Tempo	Contagem regressiva do forno
1º	6 minutos	9 minutos

2°	3 minutos	6 minutos
3°	3 minutos	3 minutos
4°	3 minutos	0 minutos

Obs.: Ao final de cada ciclo completar a solução tampão de modo que as lâminas permaneçam cobertas pelo tampão.

- Ao fim dos 15 minutos manter as lâminas no forno desligado por mais 20 minutos.
- Transferir as lâminas das cubas para a bandeja e pingar PBS.
- ◆ Sem recuperação antigênica

Deixar as lâminas na bandeja. Os cortes devem estar cobertos com PBS pois NÃO podem secar.

2.6. INCUBAR COM OS ANTICORPOS PRIMÁRIOS

- ◆ Sugar o excesso de PBS.
- ◆ Pingar os anticorpos primários, de acordo com o mapa.
- ◆ Vedar as bandejas com fita crepe e deixar na geladeira por pelo menos 16 horas.
- ◆ Lavar com PBS e pingar o PBS nos cortes.

2.7. INCUBAR COM OS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS

- ◆ Sugar o excesso de PBS com a bomba de vácuo.
- ◆ Pingar PBS e sugar novamente
- ◆ Pingar os anticorpos secundários

anti-mouse ----- 1:160
anti-rabbit ----- 1:300

- ◆ Incubar por 1 hora em temperatura ambiente.
- ◆ Lavar com PBS e pingar PBS nos cortes.

2.8. INCUBAR COM A SOLUÇÃO ABC

- ◆ Preparo da solução

A solução deve ser preparada 30 minutos antes do uso.

- Normal (para 40 lâminas)

Avidina ----- 1 gota
Biotina ----- 1 gota
PBS ----- 5ml

- Elite (para 40 lâminas)

Avidina ----- 2 gotas
Biotina ----- 2 gotas
PBS ----- 5ml

- ◆ Sugar o excesso de PBS com a bomba de vácuo.
- ◆ Pingar PBS e sugar novamente
- ◆ Pingar a Solução ABC e incubar por 45 minutos em temperatura ambiente.
- ◆ Lavar com PBS e pingar PBS nos cortes.

2.9. INCUBAR COM O CROMÓGENO - DAB

- ◆ Preparo do DAB (para 40 lâminas)
- Solução de H₂O₂

H₂O₂ 30 volumes ----- 0,1ml
PBS ----- 0,9ml

- Solução de DAB

A solução de DAB deve ser preparada 5 minutos antes do uso.

Trizma para DAB ----- 10 ml
DAB ----- 10mg
PBS ----- 5ml

Solução de H₂O₂ ----- 0,2ml

- ◆ Sugar o excesso de PBS com a bomba de vácuo.
- ◆ Pingar PBS e sugar novamente
- ◆ Pingar a solução de DAB e deixar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- ◆ Lavar com água corrente da torneira e escorrer o excesso.

2.10. CONTRA-CORAR

- ◆ Pingar e incubar com o corante.
 - Para cortes com imunocoloração citoplasmática:

Pingar Hematoxilina de Harris e deixar por 20 segundos.

Lavar com água corrente da torneira e escorrer o excesso.

Dar um banho em água amoniacal

- Para cortes com imunocoloração nuclear:

Pingar Metilgreen e deixar por 5 minutos.

Passar as lâminas na cuba com álcool isopropílico.

2.11. DESIDRATAR E MONTAR

- ◆ Retirar as lâminas das bandejas e colocá-las em berços
- ◆ Desidratar como de rotina (H-E)

Álcool absoluto----- 5 passagens

Xilol----- 3 passagens

- ◆ Montar as lâminas com resina sintética (Permout).

3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.1. COLHEITA DAS AMOSTRAS

O tecido deve ser manipulado com muito cuidado para evitar artefatos. Após a retirada da amostra, deve-se recortá-la em fragmentos com tamanho máximo de 1mm de espessura. Deve-se usar metade de uma gilete nova para o recorte do material. Os fragmentos não devem ser pegos com pinça, pois podem ser esmagados.

Devem ser colocados no fixador imediatamente após a colheita

3.2. FIXAÇÃO SEQUENCIAL DAS AMOSTRAS

Esse método combina a fixação com o glutaraldeído e pós fixação com tetróxido de ósmio. Imediatamente após a colheita as amostras devem ser fixadas por imersão em Solução de Glutaraldeído 2,5% (tampão cacodilato de sódio-0,1M pH7,3), no mínimo por 3 horas.

A seguir devem ser pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% (tampão cacodilato de sódio 0,2M pH7,4), e para tal realiza-se o seguinte o processamento:

Tampão Fosfato 0,1M pH7,3 ----- lavar 3 vezes de 5 minutos cada

Tetróxido de ósmio 1% (novo)----- 2 horas em saco escuro

H₂O destilada ----- lavar 3 vezes de 5 minutos

Uranila ----- 2 horas

3.2.1. Soluções de Fixação e Pós-fixação

3.2.1.1. Solução de Glutaraldeído 2,5%

3.2.1.1.1. TAMPÃO FOSFATO 0,2M PH7,3

Fosfato de sódio monobásico 0,2M ----- 23ml

Fosfato de sódio dibásico 0,2M ----- 77ml

Água destilada ----- q.s.p. 200ml

3.2.1.1.2. FIXADOR

Glutaraldeído 25% ----- 10ml

Tampão Fosfato 0,2M pH7,3----- 90ml

3.2.1.2. Solução de Glutaraldeído 2,5% em Cacodilato de Sódio

3.2.1.3. Solução de Tetróxido de Ósmio

Tetróxido de Ósmio -----	ampola 1g
Água destilada -----	50ml
Tampão fosfato 0,2M pH 7,3 -----	50ml

Quebrar a ampola de Tetróxido de Ósmio em vidro escuro contendo a água destilada. Acrescentar o tampão fosfato.

Deixar 15 horas sob refrigeração, para completa dissolução dos cristais. Separar em alíquotas de 1ml que podem ser estocadas em congelador.

3.2.1.4. Solução de Uranila

3.3. DESIDRATAÇÃO

Os fragmentos são desidratados por passagens em séries crescentes de álcool etílico ou de acetona:

3.3.1. Desidratação com Álcool Etilico

Álcool 50° -----	15 minutos
Álcool 75° -----	15 minutos
Álcool 95° -----	15 minutos
Álcool absoluto -----	2 passagens de 15 minutos
Acetona + resina pura (1:1) -----	24 horas
Resina pura -----	1 hora na estufa 37°C sem tampa

3.3.2. Desidratação com Acetona

Acetona 50% -----	2 passagens de 10 minutos
Acetona 70% -----	2 passagens de 10 minutos
Acetona 90% -----	2 passagens de 15 minutos
Acetona 100% -----	3 passagens de 15 minutos
Acetona + resina pura (1:1) -----	24 horas
Resina pura -----	1 hora na estufa 37°C sem tampa

3.4. INCLUSÃO

As amostras são impregnadas e incluídas em resina Araldite ou Epóxi 812. Os blocos de resina contendo as amostras devem permanecer na estufa a 60°C por 24 horas, para que a resina polimerize.

3.4.1. Preparo da Resina

3.4.1.1. Araldite

Araldite ¹ -----	54ml / 61,24g
DDSA ² -----	46ml / 47,14g
DMP30 ³ -----	1,5 a 2ml

3.4.1.2. Epóxi 812

Epon 812 -----	45ml
DDSA -----	30ml
NMA -----	25ml
DMP-30 -----	1 a 1,5 ml

¹ Polysciences: cat # 00552

² Polysciences: cat # 00563

³ Polysciences: cat # 00553

3.5. CORTES SEMIFINOS

3.5.1. Preparo dos Blocos

Os blocos de inclusão limpos devem ser submetidos à redução da superfície de corte. Esse processo é conhecido como trimagem ou toilette.

3.5.1.1. Preparo das Navalhas de Vidro

3.5.1.2. Microtomia

Os cortes semifinos devem ser realizados em ultra-micrótomo e possuir cerca de 0,5-1 μ m (vermelho, amarelo ou verde)

3.5.2. Coloração

Os corte obtidos são corados com Azul de Metileno - Azur II.

O corante deve ser colocado sobre o corte e deve ser aquecido até formar um halo metálico ao redor do corante.

3.5.2.1. Preparo do Corante Azul de Metileno - Azur II

Solução A: Azul de metileno 1% em sol. aquosa de bórax 1%

Solução B: Azur II 1% em água.

Solução de Trabalho: Solução 1:1 das soluções A e B.

3.5.3. Seleção da Área para o Corte Ultra-Fino

3.6. CORTES ULTRAFINOS

3.6.1. Preparo dos Blocos

Os blocos de inclusão limpos devem ser submetidos à nova trimagem ou toilette, de acordo com as especificações obtidas durante a seleção da área de corte.

3.6.2. Microtomia

Os cortes ultrafinos são obtidos no ultramicrótomo utilizando navalha de diamante. Os cortes ultrafinos devem possuir cerca de 70nm (prata) de espessura.

Eles são colocados em telas (grades) de cobre (podem ser de níquel, ouro ou platina) formadas por uma fina malha metálica.

3.6.3. Contraste dos Cortes Ultrafinos

Os cortes já nas telas sofrem o processo de coloração ou contraste com acetato de uranila (CO₂ sensível) e citrato de chumbo 0,2%.

3.6.3.1. Solução de Acetato de Uranila

Para Araldite: Solução saturada (5-7%) em água destilada ou álcool 50%

Para Epon: Solução 1-2% em água destilada ou álcool 50%

- ◆ Contraste com a Solução de Acetato de Uranila

Colocar cada tela numa gota da solução durante 30 minutos.

3.6.3.2. Solução de Citrato de Chumbo

Nitrato de Chumbo ----- 1,33g

Citrato de Sódio ----- 1,76g

Água destilada ----- q.s.p. 50ml

Solução de NaOH 1N ----- 8ml

Misturar o Nitrato de Chumbo, Citrato de Sódio e 30ml de água destilada em balão volumétrico e agitar vigorosamente até assumir aspecto leitoso (cerca de 20-60 minutos).

Adicional o NaOH e misturar por inversão. Completar o volume para 50ml com água destilada. Deixar em repouso por pelo menos 24 horas.

- ◆ Contraste com a Solução de Citrato de Chumbo

Colocar cada tela numa gota da solução durante 5-30 minutos (geralmente 20 minutos).

Diferenciar com solução de NaOH 0,02N.

Lavar em água e deixar secar.

3.7. FOTOMICROGRAFIAS

A avaliação dos espécimes é realizada efetivamente através das fotomicrografias obtidas no Microscópio Eletrônico de Transmissão, operado a 60kV.

Anexo C - Especificações Técnicas dos Anticorpos Utilizados



Specification Sheet

**FITC-Conjugated
Rabbit Anti-Human
C3c Complement
Code No. F 0201
Lot 039**

Presentation	<p>DAKO FITC-Conjugated Rabbit Anti-Human C3c Complement is the purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1.</p> <p><u>Solvent</u>: 0.01 mol/L PBS, 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2.</p> <p><u>Protein concentration</u>: 3.6 g/L.</p> <p><u>Antibody titre</u>: 400 mg/L (mg of antigen to be added to 1 L of antibody to reach equivalence point).</p> <p><u>F/P ratio</u>: $E_{495\text{ nm}}/E_{278\text{ nm}} = 0.65 \pm 0.05$ corresponding to a molar FITC/protein ratio of 2.5.</p>
Immunogen	C3c complement isolated from complement-activated human serum.
Specificity	<p>The antibody reacts with human C3c complement and with the C3c part of C3 and C3b. The specificity has been ascertained as follows:</p> <p><u>Crossed immunoelectrophoresis</u>: Only the C3c complement precipitation arch appears when using 40 µL DAKO F 0201 per square cm gel area against 2 µL complement-activated human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.</p> <p>Traces of contaminating antibodies have been removed by solid-phase absorption with human plasma proteins.</p> <p>The antibody cross-reacts with C3c complement from all of 11 animal species tested so far by double immunodiffusion: Cat, cow, dog, goat, guinea pig, kangaroo, mink, mouse, rat, sheep and swine.</p>
Application	<p>DAKO FITC-Conjugated Rabbit Anti-Human C3c Complement is well-suited for the demonstration of complement C3 in tissues, but it may also be used for other immunofluorescence techniques.</p> <p>GUIDELINE FOR DILUTION</p> <p>Tissue staining: 1:75-1:100.</p>
Storage	In the dark at 2-8 °C.

F 0201/MKB/30.03.99



Specification Sheet

**FITC-Conjugated
Rabbit Anti-Human IgA,
Specific for Alpha-Chains**
Code No. F 0204
Lot 098

Presentation	<p>DAKO FITC-Conjugated Rabbit Anti-Human IgA is the purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1.</p> <p><u>Solvent</u>: 0.01 mol/L phosphate-buffered saline, 15 mmol/L Na₂HPO₄, pH 7.2.</p> <p><u>Protein concentration</u>: 2.8 g/L.</p> <p><u>Antibody titre</u>: 200 mg/L (mg of antigen to be added to 1 L of antibody to reach equivalence point).</p> <p><u>F/P ratio</u>: $E_{495 \text{ nm}}/E_{278 \text{ nm}} = 0.65 \pm 0.05$ corresponding to a molar FITC/protein ratio of 2.5.</p>
Immunogen	IgA isolated from human serum.
Specificity	<p>The antibody reacts with the α-chain of human IgA. Unwanted antibodies have been removed by solid-phase absorption with human plasma proteins.</p> <p>The specificity has been ascertained as follows:</p> <p><u>Crossed immunoelectrophoresis</u>: Only the IgA precipitation arch appears when using 25 μL antibody per square cm gel area against 2 μL human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.</p> <p><u>ELISA</u>: In indirect ELISA no reaction is seen with human IgG and IgM. In double antibody sandwich ELISA no reaction is observed with human plasma stripped of IgA.</p> <p><u>Immunofluorescence</u>: When tested at a dilution of 1:20 - 1:40 on human monoclonal bone marrow cell preparations the antibody gives a strong and specific staining of IgA containing cells.</p>
Application	<p>DAKO FITC-Conjugated Rabbit Anti-Human IgA is well-suited for the demonstration of IgA in tissues, but may also be used for other immunofluorescence techniques.</p> <p>GUIDELINE FOR DILUTION</p> <p><u>Immunofluorescence techniques</u>: 1:20 - 1:40 on human bone marrow cells.</p>
Storage	In the dark at 2 - 8 °C.

F 0204/MKB/09.09.98

PRODUCT SPECIFICATIONS

DESCRIPTION: Monoclonal anti-Desmoglein

CATALOG NO.: H54174M

LOT NO: 2F1669 **CLONE:** DG3.10

SOURCE: Mouse ascitic fluid **ISOTYPE:**
IgG1

PURIFICATION: Protein A affinity chromatography

IMMUNIZING

ANTIGEN: "Band 3" polypeptide of isolated desmosomes from bovine muzzle epidermis

SPECIFICITY: Desmoglein ("band 3" polypeptide; 165 kDa) unique to desmosomes from all mammals tested so far. Desmosomes of all true epithelia, notably stratified (e.g. epidermis, hair follicles, mucosa of tongue and oesophagus, exocervix, cornea), transitional (ureter, bladder), complex (e.g. trachea and bronchi, mammary gland ducts and alveoli) and simple epithelia (e.g. hepatocytes, intestinal mucosa) as well as myocardial tissue, arachnoid cells of meninges and dendritic follicular cells of lymph nodes. The antibody does not react with cells and tissues containing plaque-bearing junctions of the nondesmosomal type (e.g. zonulae adherentes, fasciae adherentes, puncta adherentia). BMGH+H, BMGE-H (bovine mammary gland epithelial cells), MDBK (bovine kidney epithelial cells); A-431, MCF-7, TR-146, PLC and various other human epithelial cell lines all stain positively with this antibody. The antibody does not react with non-epithelial and epithelioid cells lacking true desmosomes, including lens and endothelial cell lines.

APPLICATIONS: *Research, histology, pathology, cell typing in production

*Western blotting.

*Frozen tissue and paraffin embedded tissue when using the microwave method.

CROSS REACTIVITY: Recognizes bovine and rat

PRESENTATION: The monoclonal is presented as 50 ug lyophilized material. Reconstitute with 1 ml distilled water. Upon reconstitution, this product contains 10mM sodium azide and 1% BSA. We recommend that each laboratory determine an optimum working titer for use in its particular application.

STORAGE: Store at 2-8°C for up to 1 month. For long term storage aliquot and store at -20°C.

REFERENCES: Koch, P.J. et al. Eur. J. Cell Biol. 53, 1-12 (1990)

Wheeler. G.N. et al. Eur. J. Cell Biol. 88, 4796-4800 (1991)

Schmetz, M. & Franke, W.W. Eur. J. Cell Biol. 61, 274-289 (1993) Schafer, S. et al. Exp. Cell Res. 211, 391-399 (1994)

FOR RESEARCH USE ONLY NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

6/15/99

PRODUCT SPECIFICATIONS

DESCRIPTION: Monoclonal anti-Desmoglein

CATALOG NO.: H54174M

LOT NO: 2F1669 **CLONE:** DG3.10

SOURCE: Mouse ascitic fluid **ISOTYPE:**
IgG1

PURIFICATION: Protein A affinity chromatography

IMMUNIZING

ANTIGEN: "Band 3" polypeptide of isolated desmosomes from bovine muzzle epidermis

SPECIFICITY: Desmoglein ("band 3" polypeptide; 165 kDa) unique to desmosomes from all mammals tested so far. Desmosomes of all true epithelia, notably stratified (e.g. epidermis, hair follicles, mucosa of tongue and oesophagus, exocervix, cornea), transitional (ureter, bladder), complex (e.g. trachea and bronchi, mammary gland ducts and alveoli) and simple epithelia (e.g. hepatocytes, intestinal mucosa) as well as myocardial tissue, arachnoid cells of meninges and dendritic follicular cells of lymph nodes. The antibody does not react with cells and tissues containing plaque-bearing junctions of the nondesmosomal type (e.g. zonulae adherentes, fasciae adherentes, puncta adherentia). BMGH+H, BMGE-H (bovine mammary gland epithelial cells), MDBK (bovine kidney epithelial cells); A-431, MCF-7, TR-146, PLC and various other human epithelial cell lines all stain positively with this antibody. The antibody does not react with non-epithelial and epithelioid cells lacking true desmosomes, including lens and endothelial cell lines.

APPLICATIONS: *Research, histology, pathology, cell typing in production

*Western blotting.

*Frozen tissue and paraffin embedded tissue when using the microwave method.

CROSS REACTIVITY: Recognizes bovine and rat

PRESENTATION: The monoclonal is presented as 50 ug lyophilized material. Reconstitute with 1 ml distilled water. Upon reconstitution, this product contains 10mM sodium azide and 1% BSA. We recommend that each laboratory determine an optimum working titer for use in its particular application.

STORAGE: Store at 2-8°C for up to 1 month. For long term storage aliquot and store at -20°C.

REFERENCES: Koch, P.J. et al. Eur. J. Cell Biol. 53, 1-12 (1990)
Wheeler. G.N. et al. Eur. J. Cell Biol. 88, 4796-4800 (1991)
Schmetz, M. & Franke, W.W. Eur. J. Cell Biol. 61, 274-289 (1993)
Schafer, S. et al. Exp. Cell Res. 211, 391-399 (1994)

FOR RESEARCH USE ONLY NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

6/15/99

FERNANDES, C. G. *Contribuição ao Estudo da Patogenia de uma Genodermatose Mecanobolhosa em Búfalos Murrah*. Botucatu, 2001. 170p. Tese de Doutorado (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

Realizou-se o estudo da patogenia de uma genodermatose mecanobolhosa que acomete búfalos Murrah. Para tal, 5 amostras de pele (íntegra, submetida a 3 graus diferentes de lesão e pele cicatrizada) de cada um dos 5 animais experimentais (4 do rebanho experimental/EMBRAPA-CPACT para obtenção de doentes e um de outro rebanho). As amostras foram destinadas a estudos de Imunofluorescência Direta para a pesquisa das frações do complemento e de auto-anticorpos, de Imuno-histoquímica para desmoplaquinas I e II e de Microscopia Eletrônica de Transmissão. A imunofluorescência foi negativa para frações C1 e C3 do complemento e para IgG nas peles dos búfalos doentes e nos controles negativos. As desmoplaquinas I e II apresentaram marcação idêntica nos doentes e controles. Na Microscopia Eletrônica verificou-se que a perda da adesão célula-célula é o evento primário na doença e que as alterações nos complexos desmossomos-tonofilamentos são consequência do primeiro. Os resultados desse trabalho permitem então concluir que a Genodermatose Mecanobolhosa dos Búfalos Murrah não tem caráter auto-imune e é uma doença dos desmossomos, que se deve provavelmente a alterações na estrutura e/ou estabilidade e funcionamento das caderinas desmossômicas e não a defeitos nas proteínas da placa do desmossomo.

FERNANDES, C. G. *Contribution to the pathogenesis study of a Mechanobullous genodermatosis in Murrah Water Buffalos*. Botucatu, 2001. 170p. Tese de Doutorado (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

The pathogenesis of a Mechanobullous Genodermatosis of Murrah Water Buffalos was studied. Five skin samples (undamaged, mild to severe injured and healed skin) from each one of five animals (4 from an EMBRAPA-CPACT experimental herd and 1 from another one) were collected. In these samples were performed tests of direct immunofluorescence to C1 and C3 complement fractions and IgG autoantibody, of desmoplakin I/II immunohistochemistry and of transmission electron microscopy. The immunofluorescence was negative to C1, C3 and IgG autoantibodies in skin of affected and normal water buffalo. Desmoplakin I/II immunostaining was similar in skin of affected and health. Electron microscopy revealed that the loss of cell-cell adhesion was a primary event in this disease. Disruption of tonofilaments-desmosomes complexes was consequence of the former lesion. With these results was possible to conclude that the Mechanobullous Genodermatosis of Murrah Water Buffalos is not an autoimmune disease. Desmosomes are the key-point in this illness that occur, probably, due to defects on stability, structure or function of desmosomal cadherins and not owing to alterations in desmosomal plaque proteins.

Autorizo a reprodução deste trabalho, mediante referência ao autor.

Botucatu, julho de 2001.

CRISTINA GEVEHR FERNANDES

Este trabalho foi redigido de acordo com as Normas para Publicações da UNESP,
Teses e Dissertações, volume 4, 1998.