

KERSTIN TANIGUCHI ABAGGE

**AVALIAÇÃO DE DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E
COMPLEMENTO PELA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE
EM CORTES DE PELE FIXADOS EM FORMALINA E
INCLUÍDOS EM PARAFINA**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação – MESTRADO EM
PEDIATRIA, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, para a
obtenção do Título de MESTRE EM
PEDIATRIA**

**Orientadora: Profa. Leide Parolin
Marinoni**

**Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu
Ioshii**

**CURITIBA
1999**

KERSTIN TANIGUCHI ABAGGE

**AVALIAÇÃO DE DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E
COMPLEMENTO PELA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE
EM CORTES DE PELE FIXADOS EM FORMALINA E
INCLUÍDOS EM PARAFINA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Pediatria do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

**Prof. Dr. José Fillus Neto
Departamento de Patologia Básica – UFPR**

**Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho
Departamento de Pediatria – UFPR**

**Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes
Departamento de Clínica Médica – UFMG**

Curitiba, 1^o de fevereiro de 1999

O aprendizado é como o horizonte: não há limites

Provérbio Chinês

Aos meus pais Cassio e Marina que me ensinaram a amar, a lutar e a vencer.

Ao Marcelo que, com seu carinho e determinação, não me deixou desistir.

Ao meu irmão Gustavo que me apóia hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

À **Profª Leide Parolin Marinoni**, pelo carinho e dedicação ao ensino da Dermatologia Pediátrica e pela credibilidade, apoio e amizade na realização deste projeto.

Agradeço especialmente ao **Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii**, co-orientador e amigo, por sua dedicação, disposição e incentivo ao longo desta jornada.

Ao **Prof. Izrail Cat**, pela formação profissional e ética e constante incentivo.

Ao **Prof. Dr. Bonald Figueiredo**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Pediatria da Universidade Federal do Paraná, pela dedicação ao Curso de Pós-Graduação.

Ao **Prof. Luiz de Lacerda Filho**, Chefe do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná, pelo espírito de equipe e estímulo profissional e humano.

Ao **Prof. Dr. Carlos E. Bacchi**, pela ajuda na análise das colorações de imunoperoxidase.

Ao **Dr. José Fillus Neto**, pelo incentivo e amizade.

Ao **Prof. Paulo Guimarães**, pela sua contribuição na análise estatística.

Ao **Prof. Juarez Parolin Gabardo**, pela colaboração na análise estatística.

À **Profª Martha Garcia Gomensoro de Sánchez**, pelo constante incentivo e orientação em Metodologia Científica.

Aos Técnicos de Laboratório: **Marcos Cesar Alves e Sumiko Nakagawa**, pela inestimável ajuda no processamento do material para a realização da técnica.

Ao **Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da UFPR**, pela concessão na utilização do material de biópsia de pacientes adultos.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, pela paciência, colaboração e boa vontade durante a coleta dos dados e realização dos cortes teciduais.

Aos Professores e Médicos do Departamento de Pediatria, pelos ensinamentos e amizade.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Pediatria, pela dedicação e formação.

À Equipe do Serviço de Dermatologia Pediátrica: Dra. Susana Giraldi, Dra. Vânia Carvalho e Dra. Jeanine Bertogna, pelo constante incentivo.

À Sra. Antônia Schwinden, pela revisão de língua.

À Sra. Léia Rachel Castellar Spósito, pela formatação.

Ao Sr. Munir Abagge, pelo auxílio na revisão e impressão.

Aos Colegas do Mestrado, pela amizade.

Aos Funcionários da Pediatria, pela paciência e colaboração.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 O SISTEMA IMUNE.....	4
3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	5
3.3 IMUNOPEROXIDASE.....	11
3.3.1 Enzimas.....	11
3.3.2 Cromógenos.....	12
3.3.3 Estudos Imuno-Histoquímicos.....	13
3.3.4 Problemas Inerentes à Técnica de Imunoperoxidase.....	22
3.4 MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA.....	23
3.4.1 Agentes Fixadores.....	23
3.4.2 Tratamento Enzimático.....	25
3.4.3 Utilização de Microondas.....	27
3.5 CONTROLE E ESTANDARDIZAÇÃO DAS TÉCNICAS.....	29
3.6 DERMATOSES COM DEPOSIÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO.....	30
3.6.1 Grupo do Pênfigo.....	31
3.6.2 Grupo dos Penfigóides.....	33
3.6.3 Herpes Gestacional.....	34
3.6.4 Dermatose da IgA Linear.....	36
3.6.5 Dermatite Herpetiforme.....	37

3.6.6	Grupo das Vasculites	39
3.6.7	Lúpus Eritematoso Sistêmico	40
3.6.8	Eritema Multiforme	42
3.6.9	Líquen Plano	42
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
4.1	SELEÇÃO DOS CASOS	44
4.2	HISTOTÉCNICA	45
4.2.1	Imunofluorescência Direta	45
4.2.2	Imuno-Histoquímica	46
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS	52
5.1	DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS	52
5.2	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	53
5.3	IMUNOPEROXIDASE	55
5.4	CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS DE IMUNOPEROXIDASE E IMUNOFLUORESCÊNCIA	56
5.5	ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO DOS DEPÓSITOS	60
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	60
6	DISCUSSÃO	62
6.1	DA AMOSTRA	63
6.2	DA FIXAÇÃO E DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	64
6.3	DA COLORAÇÃO DE FUNDO E RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	66
6.4	DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA	69
6.5	DOS RESULTADOS DA IMUNOPEROXIDASE	69
6.6	DA IMUNOFLUORESCÊNCIA	73
6.7	PROBLEMAS INERENTES À TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE	73
7	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXO 1	88
	ANEXO 2	89

LISTA DE TABELAS

1 - DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES ANALISADOS	52
2 - RESULTADOS DA ANÁLISE PELA IMUNOFLUORESCÊNCIA	54
3 - RESULTADOS DA ANÁLISE PELA IMUNOPEROXIDASE.....	55
4 - RESULTADOS DA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELOS MÉTODOS DE IF E IP	58
5- FREQUÊNCIAS DOS DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELA ANÁLISE COM OS MÉTODOS DE IF E IP.....	59
6 - FREQUÊNCIAS DAS LOCALIZAÇÕES DOS DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELA ANÁLISE COM OS MÉTODOS DE IF E IP.....	60
7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS ENCONTRADOS QUANTO À POSITIVIDADE DO DEPÓSITO E SUA LOCALIZAÇÃO.....	61

LISTA DE FIGURAS

1 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgA	49
2 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgG	49
3 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgM.....	50
4 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP –ANTICORPO ANTI-C3.....	50
5 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgA	51
6 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI –IgG.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	- avidina-biotinaperoxidase
Abs	- absoluto
Ac	- anticorpo (s)
Ag	- antígeno (s)
C	- complemento
C ₃	- terceira fração do sistema do complemento
coef.	- coeficiente
DAB	- diaminobenzidina
HG	- herpes gestacional
IF	- imunofluorescência
IFD	- imunofluorescência direta
IFI	- imunofluorescência indireta
IG	- imunoglobulina (s)
IgA	- imunoglobulina A
IgD	- imunoglobulina D
IgE	- imunoglobulina E
IgG	- imunoglobulina G
IgM	- imunoglobulina M
IHQ	- imunohistoquímica
IP	- imunoperoxidase
kD	- kilodaltons
LED	- lúpus eritematoso discóide
LES	- lúpus eritematoso sistêmico
LP	- líquen plano
ME	- microscopia eletrônica
MO	- microscopia óptica
PAP	- peroxidase-antiperoxidase
PB	- penfigóide bolhoso
PF	- pênfigo foliáceo
PHS	- púrpura de Henoch-Schönlein
PV	- pênfigo vulgar
SAP	- Serviço de Anatomia Patológica

- SIP - Serviço de Imunopatologia
- STF - solução tampão fosfato
- UV - ultravioleta

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a aplicabilidade da técnica de imunoperoxidase na localização de imunoglobulinas e complemento nas biópsias de pele de pacientes com dermatoses auto-imunes, processadas de maneira rotineira, ou seja, fixadas em formalina e incluídas em parafina. Foi pesquisada a deposição de imunoglobulinas das classes IgG, IgM e IgA e a fração C₃ do sistema do complemento em casos de dermatoses bolhosas auto-imunes, lúpus, líquen e vasculite. O estudo foi descritivo e retrospectivo, com a recuperação de material incluído em parafina do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e com a aplicação do método imuno-histoquímico da avidina-biotinaperoxidase. A revelação da coloração foi realizada com a utilização do cromógeno diaminobenzidina. Os resultados foram comparados com os obtidos pela análise com a técnica de imunofluorescência, conforme os dados contidos no livro de registro da Seção de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica. Quarenta casos foram analisados quanto ao diagnóstico clínico, histopatológico e achados da imunofluorescência. Os depósitos foram considerados positivos quando mostravam coloração marrom escura, diferente da coloração de fundo, e foram observados quatro locais de deposição: zona da membrana basal, intercelular, subepidérmico e vascular. Obteve-se deposição específica com a técnica da imunoperoxidase em 13 casos (32,5%); em cinco (12,5%), os resultados foram negativos para todas as classes de imunoglobulinas e complemento. Desta forma, obteve-se confirmação diagnóstica por este método em 45% dos casos. Pela análise com a imunofluorescência, foram obtidos depósitos específicos em 22 casos (55%) e resultaram negativos os mesmos casos negativos pela imunoperoxidase. Houve concordância de resultados positivos pelos dois métodos em apenas 6 casos (15%). A análise estatística dos resultados evidenciou que as duas técnicas foram comparáveis quanto à deposição de IgG, IgM e C₃, porém houve diferença significativa quando pesquisada a deposição de IgA ($p=0,00596$). Não houve correlação significativa dos resultados em relação aos locais de deposição. Com estes dados, concluiu-se que: a técnica de imunoperoxidase permitiu a identificação de depósitos de imunoglobulinas e complemento nos cortes parafinados; os dois métodos foram comparáveis estatisticamente quanto à deposição de IgG, IgM e C₃, porém não de IgA, e que esta técnica pode ser utilizada na avaliação de depósitos imunes na pele quando só se dispõe de material fixado em formalina e incluído em parafina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the feasibility of the immunoperoxidase technique in the localization of immunoglobulins and complement in biopsies of patients with autoimmune skin diseases routinely processed, which means, fixed in formalin and embedded in paraffin. The deposition of immunoglobulins from IgG, IgM and IgA classes as well as C₃ fraction of the complement system was searched for in cases of autoimmune bullous dermatosis, lupus, lichen and vasculitis. The study was descriptive and retrospective and samples embedded in paraffin were retrieved from the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná's Histopathology Department and submitted to the immunohistochemical method of avidin-biotin-peroxidase (ABC). The stain was developed by the utilization of the chromogen diaminobenzidine. Results were then compared to those obtained by the analysis with the immunofluorescence technique from the records at the immunopathology section of the Histopathology Department. Forty cases were analyzed in regard to their clinical, histological and immunofluorescent findings. The deposits were considered positive when yielded a dark brown color, different from the background staining and four sites of deposition were considered: basal membrane zone, intercellular, subepidermal and vascular. There was specific deposition with the immunoperoxidase technique in 13 cases (32.5%) and in five (12.5%) the results were negative to all classes of IG and C₃. Thus, there was diagnostic confirmation by this method in 45% of all cases. By the immunofluorescence analysis twenty-two (55%) positive results were obtained and there was no deposition in the same 5 cases found negative with the immunoperoxidase technique. There was agreement with the positive results yielded by the two methods in only 6 cases (15%). The statistical analysis showed that both techniques were comparable in relate to the deposition of IgG, IgM and C₃ but there was significant difference when analyzed IgA deposits ($p=0.00596$). There was no significant correlation of the results regarding the localization of the deposits. With these data it was concluded that: the immunoperoxidase technique allowed the identification of immunoglobulin and complement deposits in the paraffin sections, the two methods were statistically comparable in regard to the deposition of IgG, IgM e C₃ but not IgA, and that this technique could be used in the evaluation of immune deposits in the skin when only formalin-fixed, paraffin-embedded tissue is available.

1 INTRODUÇÃO

Várias doenças de pele cursam com a deposição de imunoglobulinas (IG) e complemento (C) na pele (PROST, 1992). A natureza auto-imune destas dermatoses tem se tornado evidente graças ao desenvolvimento de técnicas capazes de demonstrar a presença destas IG e C, contribuindo, desta forma, para o seu diagnóstico, a sua classificação e o seu tratamento (JORDON, 1980; WOODLEY e BRIGGAMAN, 1988; CEBALLOS, ACOSTA e PENNEYS, 1989).

RASKIN (1961), analisando biópsias de pacientes com dermatite de contato, foi um dos pioneiros em demonstrar a presença de depósitos de anticorpos (Ac) na pele pela técnica da imunofluorescência (IF). BURNHAM, NEBLETT e FINE (1963) foram os primeiros a relatar a deposição de imunoglobulinas na zona da membrana basal da pele de pacientes com lúpus eritematoso, descrevendo assim o teste da banda lúpica. Em seguida, BEUTNER e JORDON (1964) evidenciaram auto-anticorpos no soro de pacientes com pênfigo vulgar.

A demonstração *in situ* da deposição de IG e C é efetuada por métodos que utilizam reações antígeno-anticorpo. Para que estas reações possam ser visualizadas ou quantificadas há a necessidade da utilização de alguns marcadores, e, dentre estes, os mais utilizados são os fluorocromos, as enzimas e os compostos radioativos e eletropacos (SAMPAIO E RIVITTI, 1998, p.89). Dos métodos existentes, a imunofluorescência (IF) é a mais utilizada rotineiramente e tem sido amplamente empregada para o diagnóstico e a caracterização das dermatoses auto-imunes, que incluem os pênfigos, os penfigóides, a dermatite herpetiforme, a dermatose de IgA linear, o lúpus eritematoso, o líquen plano, algumas formas de vasculites, entre outras.

Apesar de sua ampla utilização, a associação do método de IF com algumas potenciais desvantagens, como a necessidade de microscópios especiais, a impossibilidade da manutenção permanente da coloração e a má preservação da

morfologia tecidual, encorajou o desenvolvimento de métodos alternativos de imunocoloração que poderiam contornar estes inconvenientes.

Neste sentido, a partir de 1966, técnicas utilizando marcadores enzimáticos começaram a ser descritas (NAKANE e PIERCE, 1966; DAVEY e BUSCH, 1970; BENSON e COHEN, 1970; FUKUYAMA et al., 1970; TAYLOR e BURNS, 1974).

Apesar de várias enzimas poderem ser utilizadas, a peroxidase extraída do rábano silvestre tem sido a mais freqüentemente empregada, pois é de fácil disponibilidade e de baixo custo, pode ser conjugada a Ac e não apresenta reações cruzadas com antígenos humanos. As vantagens inerentes à utilização desta técnica, denominada imunoperoxidase (IP), incluiriam a obtenção de colorações permanentes, a aplicabilidade em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, a melhor visualização da morfologia tecidual, a possibilidade da realização de colorações subseqüentes para a pesquisa de outros Ag em um mesmo fragmento tecidual e a localização ultra-estrutural dos depósitos imunes, por meio da análise por microscopia eletrônica (ME) (TAYLOR, CHIR E PHIL, 1978; MASON e GATTER, 1987).

Este estudo foi efetuado com o intuito de avaliar, em nosso meio, a aplicabilidade da técnica da imunoperoxidase para a identificação de depósitos de imunoglobulinas e de complemento em biópsias cutâneas fixadas em formalina e incluídas em parafina.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a aplicabilidade da técnica da imunoperoxidase na identificação de depósitos de imunoglobulina e complemento em biópsias cutâneas fixadas em solução de formalina a 10% e incluídas em parafina.
- Comparar os resultados obtidos pela técnica de imunoperoxidase com os demonstrados pela técnica de imunofluorescência direta em cortes congelados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O SISTEMA IMUNE

O sistema imune é composto por células e moléculas circulantes ou ligadas aos tecidos, cuja função principal é defender o organismo contra possíveis agressores. A resposta imune, que pode ser natural ou adquirida, seria, então, a ação integrada deste sistema contra as substâncias estranhas. A natural, também denominada inata ou nativa, não é aumentada pela exposição às substâncias estranhas e existe já antes da introdução destas. Ela é mediada por barreiras físicas, células de defesa circulantes (p. ex. fagócitos) e substâncias derivadas dos macrófagos ou proteínas sangüíneas, tais como as citocinas e os componentes do sistema do complemento. A imunidade adquirida ou específica é determinada pela exposição repetida a determinados agentes e é específica para diferentes substâncias. Por convenção, “resposta imune” refere-se a eventos que geram imunidade específica, e as substâncias que geram este tipo de resposta são denominadas antígenos (Ag) ou imunógenos (ABBAS, 1995).

Quando há a penetração de antígenos no organismo, esses são inicialmente processados por macrófagos que possuem receptores tipo imunoglobulina (IG) em sua superfície. Esses macrófagos, denominados células apresentadoras de antígenos, transmitem a mensagem antigênica a linfócitos específicos, os linfócitos T, os quais são então “ativados”, ou seja, estimulados a secretar produtos que estimulam o fagócito a destruir o Ag, ou ainda, a diretamente destruir as células antigênicas. Esta é a chamada imunidade celular. Na pele, as principais células apresentadoras de Ag são as células de Langerhans, derivadas da medula óssea. Elas inicialmente fagocitam o Ag, realizam seu processamento e o expõem em sua superfície celular aos linfócitos T.

Os Ag também estimulam uma segunda classe de linfócitos, os linfócitos B, os quais irão produzir anticorpos específicos para neutralizar os Ag, as imunoglobulinas, e esta é a chamada imunidade humoral. As IG compõem-se de cadeias polipeptídicas

duplas ligadas entre si por pontes sulfidrílicas e, de acordo com a combinação destas cadeias, haverá a formação de 5 diferentes classes de IG, encontradas no soro em concentrações variáveis. São as chamadas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (EMANCIPATOR e LAMM, 1994; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.50).

3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de IF é usada para a detecção de antígenos em tecidos ou em suspensões de células.

COONS, CREECH e JONES (1941) utilizaram um derivado β -antril-carbamido ligado a Ac antipneumocócicos de coelho para a identificação dos pneumococos tipo III, que se tornavam fluorescentes à luz ultravioleta.

COONS et al. (1942) aplicaram a técnica de imunofluorescência num estudo desenvolvido na *Harvard Medical School*. Este estudo visava ao desenvolvimento de um método para a detectar a presença e a localização de substâncias antigênicas específicas no soro de mamíferos, com a utilização de Ac marcados com uma substância fluorescente, e a sua visualização com o auxílio de um microscópio de luz ultravioleta (UV).

A aplicação deste método para diagnósticos em humanos foi feita primeiramente na doença renal e a sua utilização em dermatopatologia teve início na década de 1960 com o estudo das dermatites de contato.

RASKIN (1961) obteve deposição de imunoglobulinas na derme superior de pacientes com dermatite de contato, especialmente na região papilar, bem como demonstrou a correlação entre a intensidade da fluorescência e a severidade da dermatite.

BURNHAM, NEBLETT e FINE (1963) introduziram as técnicas de IF para a detecção de imunoglobulinas em várias dermatoses e, com esse estudo, demonstraram que as lesões lúpicas mostravam fluorescência brilhante na zona da membrana basal, o que as diferenciava de outras dermatoses.

BEUTNER e JORDON (1964) descreveram a presença de auto-anticorpos contra a substância intercelular no soro de pacientes com pêfigo vulgar (PV).

Consideraram, entretanto, que outros métodos sorológicos deviam ser realizados a fim de elucidar a natureza da reação antígeno-anticorpo.

BEUTNER et al. (1965) realizaram imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI) de 20 pacientes com PV e demonstraram a presença de imunoglobulinas depositadas nas áreas de acantólise. Citaram que a acantólise parecia estar associada à combinação de Ac e Ag localizados na substância intercelular.

WALDORF et al. (1966) confirmaram os achados de Beutner e Jordon, mas encontraram várias dificuldades técnicas durante a realização do estudo de IF, entre elas: a identificação de IG em pele de pacientes normais, a fluorescência não específica de alguns cortes e a dificuldade na interpretação de cortes de pele com alto teor de melanina.

CHORZELSKI, WEISS e LEVER (1966) realizaram a pesquisa de Ac no soro de 35 pacientes com pênfigo antes e após o tratamento com corticosteróides e demonstraram uma excelente correlação entre o tratamento e a diminuição dos títulos de anticorpos.

STRINGA, BIANCHI e ZINGALE (1966) estudaram a deposição da 7S-gamaglobulina e β 1c-globulina nas lesões de pele de pacientes com vasculite nodular pela técnica de IF e sugeriram a relação direta entre uma reação imune anormal e a patogênese desta doença.

JORDON et al. (1967) identificaram Ac dirigidos contra a membrana basal no soro de pacientes com penfigóide bolhoso (PB) e defenderam que a presença destes Ac poderia ser de grande valor na diferenciação entre esta e outras dermatoses bolhosas. Enfatizaram que estes Ac pareciam ser específicos para esta doença.

THIVOLET e BEYVIN (1967) estudaram 133 soros de pacientes com várias doenças bolhosas pela IFI e citaram os benefícios desta técnica, entre eles: o acompanhamento do tratamento dos pacientes com pênfigo, que apresentariam o desaparecimento dos Ac quando obtido o controle da doença; o fornecimento de um elemento de diferenciação entre as diversas doenças auto-imunes e o futuro estabelecimento dos fatores etiológicos que levariam à formação e deposição destes Ac.

PARISH (1967) realizou um estudo de IFD em lesões de vasculite nodular com o intuito de demonstrar Ag e IG nos vasos afetados, procurando IG nativa e Ag estreptocócicos e da tuberculose.

KANO, BEUTNER e MILGROM (1968) mostraram, pela IFI, que o soro de alguns pacientes com dermatoses bolhosas reagia com linhagens celulares estabelecidas e continha Ac tipo gamaglobulina que lembrava o fator reumatóide.

PECK et al. (1968) analisaram 39 pacientes com lesões bolhosas pela técnica de IF e confirmaram a presença de anticorpos anti-substância intercelular em casos de pênfigo vulgar, bem como anticorpos contra a membrana basal em casos de pênfigoide bolhoso.

VAN DER MEER (1969) realizou um estudo de IFD para a diferenciação entre o pênfigoide e a dermatite herpetiforme, demonstrando diferenças no padrão do depósito. Nos casos de pênfigoide, o depósito na membrana basal era homogêneo, enquanto na dermatite herpetiforme, este era granular, o que permitiu a diferenciação diagnóstica entre as duas dermatoses.

BEAN (1969) mostrou a presença de Ac intercelulares no fluido da bolha de dois pacientes com pênfigo pela técnica de IF.

CHORZELSKI e BEUTNER (1969) citaram alguns fatores que poderiam contribuir para a falha em se detectar os Ac do pênfigo pela IF, entre eles a existência de um amplo espectro de especificidades destes Ac, ou seja, diferentes soros contendo Ac reativos a diferentes determinantes antigênicos da substância intercelular de diferentes epitélios. Esses autores não conseguiram demonstrar Ac na mucosa oral de pacientes com pênfigo vulgar pela IFD, apesar de terem encontrado altos títulos de Ac circulantes pela IFI. Fenômenos de interferência, devidos à presença de múltiplos Ac tissulares, também foram observados em função, provavelmente, do consumo da antiglobulina marcada por um dos Ac tissulares.

BURNHAM, FINE e NEBLETT (1970) descreveram o teste da banda lúpica como uma valiosa arma para a confirmação clínica do lúpus. Realizaram a técnica de IFD em cortes de pele de 137 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus

eritematoso discóide (LED) e erupção polimorfa à luz e detectaram a presença de uma faixa de imunoglobulinas localizada na junção dermo-epidérmica dos pacientes com LES. Defenderam que o maior valor deste teste era a confirmação precoce do diagnóstico clínico de LES nos pacientes cuja análise histopatológica havia sido inconclusiva.

Em outro estudo, BURNHAM e FINE (1971) reforçaram o valor de um teste da banda lúpica positivo na pele clinicamente normal para o diagnóstico do LES e sua correlação com uma doença mais severa.

LANDRY e SAMS JR. (1973) realizaram um estudo tentando determinar se os Ac demonstrados pela IFD na pele de pacientes com LES eram similares àqueles encontrados no rim. Concluíram que a presença de Ac na pele indicaria que o mesmo processo de formação de complexos imunes poderia estar ocorrendo em ambos os locais.

BAART DE LA FAILLE - KUYPER e BAART DE LA FAILLE (1974) demonstraram a ocorrência de fibrina e IgM na porção superior da derme de 40 casos de líquen plano estudados pela IFD.

BEUTNER et al. (1975), em uma ampla revisão dos procedimentos de IF, definiram os principais problemas com esta técnica, de acordo com três pontos de vista: a concentração dos conjugados utilizados, a relação proteína - fluoresceína destes conjugados e a definição dos sistemas de coloração e adoção de esquemas para o controle de qualidade dos procedimentos de IF.

KATZ, HERTZ e YAOITA (1976) identificaram a deposição de C₃ na zona da membrana basal de pacientes com herpes gestacional (HG) pela IFD e IFI e caracterizaram o fator responsável por esta deposição como sendo uma imunoglobulina termolábil da classe IgG, denominada “fator herpes gestacional”.

TAYLOR, CHIR e PHIL (1978) revisaram as principais vantagens e desvantagens da técnica de IF. As vantagens seriam: o menor tempo despendido na realização da técnica; a ampla gama de conjugados disponíveis; a existência de conjugados de rodamina, que permitiriam a dupla coloração, e o grande número de trabalhos envolvendo a quantificação e standardização dos reagentes, bem como a disponibilidade de equipamentos capazes de quantificar as reações em algumas

circunstâncias. As desvantagens seriam: a necessidade de microscópios especiais; a instabilidade das preparações impedindo o estoque do material; a má morfologia fornecida pelos cortes de criostato; a necessidade de tecido fresco congelado e a interferência que a autofluorescência tecidual poderia produzir na análise dos depósitos.

MERA, YOUNG e BRADFIELD (1980) utilizaram a coloração pela IF em cortes de pele de pacientes com pênfigo, penfigóide e LES, fixados em formalina e incluídos em parafina para a pesquisa de IG, complemento e fibrinogênio e obtiveram resultados bons, porém com uma menor sensibilidade do que quando utilizado material congelado. Mostraram que a digestão enzimática foi essencial e que, dos antígenos procurados, o C3 foi o mais difícil de demonstrar. Concluíram que esta técnica poderia ser utilizada quando não estivesse disponível o tecido congelado.

CRICKX (1985) referiu que a IF seria um método simples e sensível para o diagnóstico das doenças auto-imunes. A IFD detectaria depósitos de IG e complemento na pele do paciente e, encontrando Ac específicos, auxiliaria na classificação das dermatoses bolhosas. A IFI seria aplicada ao soro e identificaria Ac monoclonais ou Ac direcionados a Ag teciduais, sendo utilizada na caracterização dos Ag epidérmicos, estudos da junção dermo-epidérmica, análise de infiltração celular na derme e detecção de Ag infecciosos exógenos.

GAMMON et al. (1992) realizaram a separação da pele de pacientes portadores de doença bolhosa auto-imune, na zona da membrana basal, com solução salina de NaCl na concentração de 1 mol/L e aplicaram a técnica de IF para a detecção de IG. Esta separação tornou possível a discriminação de várias dermatoses, antes só distinguidas pela análise em ME e, principalmente, a diferenciação entre a epidermólise bolhosa adquirida e o penfigóide bolhoso.

NICOLAS et al. (1993) relataram alguns dos problemas inerentes aos métodos de IF, entre eles: o Ag deveria estar acessível a uma concentração suficiente para ser visualizado; a conservação do tecido ou do soro teria de ser adequada, sendo o congelamento imediato a técnica de escolha; as condições de realização da reação deveriam incluir controles positivos e negativos.

SANCHES JR. (1994) realizou a técnica de IFD em 18 casos de PV e 20 de PF, com e sem tratamento. Obteve deposição de C3 em todos os pacientes com PF e PV não tratados, sendo acometida toda a espessura da epiderme nos casos de PF e apenas as camadas inferiores, nos casos de PV. Concluiu ainda que deposição de IgG se deu em toda a extensão da epiderme em ambas as doenças e que a corticoterapia não alterou significativamente a positividade da IFD.

COLLINS (1994) classificou os procedimentos de IF em: direto e indireto. A IF direta utilizaria um Ac específico marcado com fluoresceína, que seria incubado com o substrato contendo o Ag a ser pesquisado. A deposição de imunorreagentes poderia então ser visualizada em microscópio de luz ultravioleta (UV). Na indireta, o tecido normal seria o substrato (geralmente esôfago de macaco). O soro do paciente seria colocado sobre este, seguido da incubação com Ac fluoresceinados, e este tipo de estudo detectaria auto-anticorpos circulantes.

GUEDES (1996) avaliou as mucosas de pacientes com PF, realizando a IFD com anticorpos anti-epiteliais contra o Ag do pênfigo foliáceo endêmico. Demonstrou a presença de depósitos granulares de IgG, IgM e C3 nos espaços intercelulares nas mucosas do prepúcio, vagina e colo do útero da maioria dos pacientes.

A coloração é descrita conforme a localização, extensão, padrão e intensidade dos depósitos. Além disso, podem ser obtidas três formas de fluorescência: fluorescência específica, não-específica e autofluorescência. A específica seria a obtida pela reação entre o substrato e a proteína marcada com o fluorocromo (reação Ag-Ac). A não-específica deve-se à impregnação dos tecidos por corante livre, proteínas fluoresceinadas ou por ambos. A autofluorescência ocorre devido à fluorescência natural dos tecidos quando expostos à luz UV (SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.89).

Os fluorocromos mais utilizados são o isotiocianato de fluoresceína, o isotiocianato de tetrametil rodamina e a ficoeritrina.

Estas proteínas altamente fluorescentes são encontradas nas organelas captadoras de luz de certas algas altamente hidrofílicas (BARNARD e COLLINS, 1987).

3.3 IMUNOPEROXIDASE

Na tentativa de superar os inconvenientes das técnicas de imunofluorescência, desenvolveram-se os métodos imunoenzimáticos, de forma a permitir máxima sensibilidade, associada à localização precisa do antígeno.

3.3.1 Enzimas

SINGER e SCHICK (1961) utilizaram a ferritina para a detecção de Ac e a sua visualização em microscopia eletrônica. Esta enzima apresentava a vantagem de ser visível à ME, poder ser facilmente preparada e ser obtida em grande quantidade a partir de tecido esplênico de cavalo. Porém, tinha a desvantagem de pouca penetração nos tecidos, possivelmente devida ao seu alto peso molecular.

AVRAMEAS e URIEL (1966) estudaram a atividade catalisadora da enzima peroxidase na revelação de complexos imunes antialbumina e antitimidina com um procedimento de imunodifusão.

NAKANE e PIERCE (1966) listaram os principais inconvenientes do método de IF, entre eles: a autofluorescência tecidual, a falta de permanência da coloração e a necessidade de microscópio de luz UV. Utilizaram a peroxidase extraída do rábano silvestre acoplada a Ac específicos e conseguiram resultados comparáveis aos obtidos com os estudos de IF. Além disso, comentaram as vantagens deste novo método, como: a coloração permanente, a possibilidade de exame com microscopia óptica (MO) comum, além da possibilidade de localização de vários Ag em um único corte, com a utilização de várias enzimas marcadoras. Esses autores explicaram a alta sensibilidade da técnica de IP pelo fato de a enzima não ser consumida na reação com o substrato. Desta forma, cada Ac marcado com a enzima que estivesse ligado ao sítio de deposição do Ag depositaria muitas moléculas do produto de reação.

NAKANE e PIERCE JR. (1967) utilizaram a fosfatase ácida conjugada com Ac. Porém, os resultados foram muito variáveis, o que deu início à procura de uma enzima mais estável e que fornecesse resultados mais fidedignos.

A peroxidase extraída do rábano silvestre é a enzima de escolha por sua disponibilidade, alta atividade enzimática, facilidade de conjugação com anticorpos, relativa estabilidade à temperatura ambiente, baixo custo e por não apresentar reações cruzadas com antígenos humanos (TAYLOR, CHIR e PHIL, 1978; HEYDERMAN, 1979; FARR e NAKANE, 1981; FALINI et al.; 1982; FALINI e TAYLOR, 1983; PENNEYS, 1984).

SAMPAIO e RIVITTI (1998, p.97) evidenciaram que várias enzimas poderiam ser utilizadas, porém, a mais freqüentemente empregada era a peroxidase, uma heme-proteína encontrada em plantas e, eventualmente, em tecidos animais, que catalisaria a oxidação de substâncias orgânicas pelo peróxido de hidrogênio.

3.3.2 Cromógenos

A peroxidase extraída do rábano silvestre, produz reações cuja cor depende do cromógeno utilizado.

O cromógeno empregado na maioria das vezes é a 3, 3'-diaminobenzidina (DAB), que fornece uma coloração marrom bem definida e diferente das colorações habitualmente empregadas para avaliação histológica comum. Porém, tem o inconveniente de apresentar potencial carcinogênico (GRAHAM e KARNOVSKY, 1966).

HANKER et al. (1977) utilizaram a p-fenilenodiamina, associada ao pirocatecol, a fim de evitar os efeitos potencialmente deletérios da diaminobenzidina. Obtiveram um produto de reação osmiofílico, mais azulado, insolúvel e de boa visualização à ME, além de não possuir efeito carcinogênico.

TAYLOR, CHIR e PHIL (1978) referiram que a alfa-naftol-pironina produziria uma coloração vermelha, menos evidente do que a obtida com a DAB e seria facilmente removida com álcool, o que torná-la-ia de pouca utilização.

DOHERTY et al. (1989) citaram outros cromógenos disponíveis: a 3-amino-9-etilcarbazol, que forneceria coloração vermelha; o 4-cloro-1-naftol, que coraria em azul; e a 2,2'-oxidietanol-4-cloronaftol, que coraria em preto.

3.3.3 Estudos Imuno-Histoquímicos

DAVEY e BUSCH (1970) utilizaram a IP para o estudo da deposição de IG na glomerulonefrite e compararam os padrões de localização e a intensidade dos depósitos com os obtidos pela técnica de IF. Avaliaram 14 biópsias renais congeladas quanto à deposição de IgA, IgG e IgM e encontraram excelente correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Entretanto, salientaram algumas desvantagens da técnica de IP: a conjugação e a coloração foram mais demoradas; durante alguns dos passos da coloração, houve descolamento dos fragmentos das lâminas; foi necessária a utilização de ventiladores para dissipar os gases liberados pela utilização de ácido ósmico; houve maior coloração de fundo; a coloração de fundo apareceu em alguns cortes de controle, indicando a presença de peroxidase endógena, principalmente em locais de inflamação aguda e nos túbulos renais contendo cilindros leucocitários.

BENSON e COHEN (1970) utilizaram a IP para a identificação de Ac antinucleares em pacientes com LES, artrite reumatóide e esclerose sistêmica progressiva. Detectaram positividade em 34 dos 36 pacientes lúpicos, 8 dos 25 pacientes com artrite reumatóide e em 6 dos 11 portadores de esclerose sistêmica. Esses autores demonstraram que o método da IP era tão sensível quanto a IF para a detecção destes Ac.

FUKUYAMA et al. (1970) estudaram pacientes com pênfigo, penfigóide e lúpus pelas técnicas de IP e IF, utilizando os métodos direto e indireto em amostras de pele congeladas. Obtiveram resultados comparáveis com ambas quanto à localização do depósito. Amostras guardadas por mais de um ano não demonstraram qualquer alteração, tanto na qualidade quanto no grau de coloração.

PETTS e ROITT (1971), em um estudo comparativo entre as duas técnicas, demonstraram que a sensibilidade dos dois métodos foi idêntica, pela análise direta dos anti-soros conjugados com peroxidase e fluoresceína em um painel de titulação.

DORLING et al. (1971), ao avaliarem 24 amostras de soro de pacientes na procura de fator antinuclear pelas técnicas de IF e IP, demonstraram que a sensibilidade do método da IP foi comparável à obtida pela técnica de IF. Além das

vantagens desta técnica já citadas por outros autores, referiram que o aumento no tempo de coloração com a IP era de apenas 20 minutos, o que não representava grande diferença no tempo total dos dois procedimentos.

THIVOLET et al. (1971) utilizaram a técnica de IP para a pesquisa de IG em casos de penfigóide bolhoso, pênfigo, lúpus agudo disseminado e lúpus discóide, com resultados semelhantes aos obtidos pelo método de IF, ao analisarem amostras de tecido congelado com ambas as técnicas. Concluíram que a combinação das duas técnicas deveria permitir a resolução de certos problemas como a localização de IG e C na derme ou a fluorescência não-específica.

AVRAMEAS (1972) definiu que a maior vantagem das técnicas imunoenzimáticas era o fato de que o mesmo reagente poderia ser empregado tanto para estudos quantitativos quanto qualitativos em nível de MO e ME. A quantidade de enzima presente em uma célula poderia ser determinada se utilizados os procedimentos correntemente empregados em enzimologia, para a mensuração da atividade catalisadora destas enzimas.

MURPHY, DEODHAR e CAWLEY (1973) mostraram que, apesar dos resultados serem comparáveis com as duas técnicas, uma maior sensibilidade foi obtida pelo método de IF, em 169 amostras de soro pelo método indireto, bem como em 15 amostras de tecido renal e 18 de pele congeladas pelo método direto. Neste estudo, foram pesquisados anticorpos antinucleares, antimitocondriais, antimúsculo liso, antimembrana basal e anti-substância intercelular.

LEUNG-TACK, MONIER e THIVOLET (1973) estudaram comparativamente as técnicas de IF e IP, na pesquisa de Ac antinucleares. Esfregaços de sangue e cortes congelados de fígado de ratos infectados pelo *Trypanosoma gambiense* foram usados como substrato. Os resultados mostraram maior sensibilidade da técnica de IF nos esfregaços sangüíneos quando comparados ao tecido hepático e a IP mostrou resultados semelhantes nos dois substratos. Concluíram que o método de IP era tão sensível quanto o de IF, com as vantagens de permitir uma melhor visualização do contorno das células e possibilitar o armazenamento das amostras e a análise em MO comum. Entretanto, era uma técnica mais complexa e demorada.

BURNS, HAMBRIDGE e TAYLOR (1974) compararam os resultados obtidos com as técnicas de IF e IP, tanto em material fixado em formalina e incluído em parafina, como em material congelado. Esses autores pesquisaram a presença de imunoglobulinas intracelulares em cortes de baço e linfonodo e demonstraram que: a técnica de IP foi superior em mostrar a morfologia tecidual; que a sensibilidade da técnica de IF foi um pouco maior que a da IP principalmente devido à coloração de fundo maior com este último método, e que a especificidade das duas técnicas foi semelhante. Referiram ainda que os resultados de estudos-piloto na pesquisa de IG extracelulares pelo método de IP e IF em cortes parafinados não foram tão bons quanto os encontrados com a utilização de material congelado.

BOORSMA, NIEBOER e KALSBECK (1975) estudaram as técnicas de IP direta e ponte IG-enzima comparando-as à de IF em 533 biópsias de pele congeladas de pacientes com LES, LED, penfigóide bolhoso, pênfigo vulgar e rosácea, entre outras dermatoses. Morfologicamente, os padrões de depósito de IgG obtidos com os três métodos foram semelhantes em 96% dos casos. Os métodos de IP mostraram alguma coloração de fundo, possivelmente devida à atividade da peroxidase endógena encontrada nas células inflamatórias e nos vasos. O mesmo padrão de coloração de fundo foi visto pela técnica de IF.

BELLON, SAPIN e DRUET (1975) compararam as duas técnicas em amostras de tecido renal congelado e demonstraram que, no método direto, a técnica de IP foi superior à de IF na pesquisa de IgG. No entanto, a sensibilidade da IF foi maior conforme o aumento da taxa de marcação, sem acentuar a fluorescência inespecífica. No método indireto, a sensibilidade da técnica de IP ainda foi superior, porém em grau menor, quando comparado ao método direto.

BOORSMA, STREEFKERK e KORS (1976) avaliaram dois conjugados de peroxidase na pesquisa de IgG em cortes congelados de pele. Um foi preparado com glutaraldeído e o outro, com periodato, e os resultados obtidos foram comparados com a avaliação pela IF. O conjugado preparado com glutaraldeído demonstrou resultados comparáveis aos obtidos pela IF. Já o preparado com periodato foi menos efetivo na demonstração dos depósitos.

ZANIN et al. (1978) realizaram um estudo comparativo da sensibilidade entre as duas técnicas (IF e IP), analisando cortes de pele congelados, sendo 3 casos de pênfigo, 7 de penfigóide, 5 de LES, 3 de dermatite herpetiforme e 6 de vasculite. Em quase todos os casos a coloração obtida pela técnica de IP não foi superior àquela obtida pela IF. Nos casos em que a IF mostrava-se fraca, a coloração pela IP foi praticamente nula. Concluíram que a IF permanecia como técnica de escolha na análise em MO, ficando a IP destinada aos estudos que necessitassem de análise ultra-estrutural.

TAYLOR, CHIR e PHIL (1978), em uma ampla revisão sobre os procedimentos de IP, evidenciaram que a maior vantagem desta técnica era a possibilidade da utilização de material fixado em formalina e incluído em parafina, o que permitiria estudos detalhados da arquitetura tecidual, análises retrospectivas e a coloração simultânea para a identificação de dois ou mais antígenos em um mesmo fragmento. A visualização da morfologia tecidual após a contra-coloração foi a mesma observada com a MO convencional. Além disso, os cortes poderiam ser avaliados por microscopia eletrônica, permitindo assim a localização específica dos sítios antigênicos, bem como o estudo da ultra-estrutura celular. Referiram ainda que os procedimentos de IP tinham muito em comum com as técnicas de IF, com limitações similares, requerendo controles rigorosos de especificidade. Salientaram que a escolha do método a ser utilizado poderia ser feita numa base racional, de acordo com o objetivo do estudo, o grau de detalhe morfológico desejado, o material disponível e a facilidade de acesso a microscópios de luz UV.

HEYDERMAN (1979) defendeu que a principal utilização do método de IP seria a identificação das linhagens celulares de vários tumores, o que poderia sugerir o possível foco primário destes. Além disso, partículas virais e outros microrganismos poderiam ser visualizados pelas técnicas de imuno-citoquímica, contribuindo em muito para o diagnóstico de várias doenças.

MERA, YOUNG e BRADFIELD (1980) usaram a técnica de IF em material fixado em formalina e incluído em parafina para avaliar o depósito de IG, complemento e fibrinogênio em doenças de pele auto-imunes (pênfigo, penfigóide e

lúpus) e compararam os resultados obtidos com o material congelado dos mesmos pacientes. A avaliação dos depósitos de C3 foi a mais difícil, com resultados negativos em todos os cortes de parafina, embora positivos nos de criostato. Defenderam a utilização desta ao invés das técnicas de IP para a pesquisa de IG e C, pois os métodos de IP não eram amplamente utilizados e eram de difícil estabelecimento como um método diagnóstico regular e reprodutível.

TROST, STEIGLEDER e BODEUX (1980) utilizaram a proteína-A marcada com peroxidase, para a detecção de Ac do tipo IgG do pênfigo e penfigóide em estudo com ME e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados pela marcação habitual com a peroxidase ligada à IG.

PINKUS (1982) fez uma breve revisão sobre os procedimentos de imunohistoquímica (IHQ) em tecidos parafinados e referiu que a fixação rápida era importante, já que alguns Ag poderiam rapidamente difundir-se para o extracelular.

FALINI et al. (1982) pesquisaram dois tipos de Ag (cadeias κ e λ) em tecido amigdaliano e de linfonodo, utilizando a peroxidase e a fosfatase alcalina simultaneamente, cada uma para a identificação de um Ag, com excelentes resultados.

TURBITT et al. (1982) analisaram 22 biópsias de pele de pacientes com doenças bolhosas, lúpus e vasculite pelas técnicas de IP e IF. As amostras foram divididas em dois fragmentos, um congelado e analisado pela técnica de IF e outro fixado em formalina e incluído em parafina para avaliação pelo método de IP. Obtiveram resultados semelhantes com ambas as técnicas e concluíram que, se fosse necessária a análise retrospectiva pela imunopatologia e só se dispusesse de tecido incluído em parafina, a IP pode fornecer resultados positivos na maioria dos casos.

FALINI e TAYLOR (1983) referiram que a identificação das IG de superfície pela IP era difícil de ser obtida em cortes parafinados devido, em parte, à desnaturação das mesmas nos processos de fixação e também pela dificuldade em se obter contraste entre a pequena quantidade de IG na superfície celular e a IG presente nos fluidos extracelulares. A tripsinização poderia facilitar a demonstração de Ag de superfície, mas foi consenso que, na pesquisa deste tipo de substância, as amostras congeladas seriam melhores.

PENNEYS (1984), em uma ampla revisão sobre as técnicas de IP, citou as principais aplicações deste método na diferenciação dos neoplasmas quanto à sua origem celular e referiu que a identificação de depósitos imunes em cortes incluídos em parafina levaria a uma grande simplificação da avaliação clínica de pacientes com dermatoses auto-imunes.

SHEIBANI e TUBBS (1984) descreveram certas limitações dos procedimentos de IP, como as reações não específicas, a coloração de fundo e o potencial de carcinogênese de alguns reagentes.

KUTZNER e KUTZNER (1986) utilizaram a técnica de IP (PAP) para a detecção de IG na pele de pacientes com dermatoses bolhosas autoimunes, lúpus e vasculite, em material fixado em formalina e incluído em parafina. Obtiveram resultados semelhantes aos observados com o método de IF e salientam a aplicabilidade dos procedimentos de IP nos estudos retrospectivos de material incluído em parafina.

MASON e GATTER (1987) defenderam que a IHQ seria uma arma importante nos casos em que não se obtém o diagnóstico pelos meios convencionais, ou seja, na diferenciação dos tumores de origem desconhecida, na detecção precoce de micrometástases pela identificação de pequeno número de células com marcadores específicos e na imunofenotipagem das neoplasias. Além disso, seria útil em estudos retrospectivos de tecido processado rotineiramente.

HAINES, COOKE e CLARK (1987) avaliaram biópsias de pele fixadas em formalina e incluídas em parafina de cães com doenças auto-imunes (pênfigo e penfigóide) pela técnica de IP. Obtiveram resultados equivalentes aos observados pelo método de IF.

REHMAN et al. (1988) avaliaram 40 biópsias de pele de pacientes com dermatoses bolhosas auto-imunes fixadas em formalina e incluídas em parafina pela técnica da IP, obtendo resultados comparáveis aos fornecidos pela técnica de IF. Concluíram que a coloração de fundo permanecia um problema, mesmo com todos os esforços para reduzi-la.

CELESTE, GUIMARÃES e CORRALES (1988) utilizaram-se dos procedimentos de IP para a identificação de Ac para a leishmaniose e encontraram resultados superiores aos obtidos pela técnica de IF.

TRUE (1988) citou a utilização de Ac monoclonais específicos para os receptores de estrogênio em amostras fixadas em formalina e em fragmentos tão pequenos quanto os obtidos por meio de aspiração com agulha, salientando seu valor no diagnóstico dos tumores.

ALVES (1989) também defendeu a utilização das técnicas de IP para o diagnóstico das neoplasias.

CEBALLOS, JIMENEZ-ACOSTA e PENNEYS (1989) relataram a utilização dos procedimentos imuno-enzimáticos para o diagnóstico de várias doenças, como a lepra tuberculóide, as infecções fúngicas, a análise de infiltrados linfocitóides e as dermatoses bolhosas subepidérmicas.

CORWIN e GOWN (1989) avaliaram vários anticorpos utilizados em IHQ concluindo que nenhum Ac oferecia sensibilidade e especificidade absolutas e que o potencial fornecido por estes marcadores permanecia dependente da experiência do patologista.

DOHERTY et al. (1989) descreveram as técnicas imuno-enzimáticas e salientaram as vantagens destes métodos sobre a IF, entre elas: a sensibilidade para permitir a visualização de muitos grupos antigênicos preservados em tecidos fixados pela formalina e incluídos em parafina; a possibilidade de colorações subseqüentes do mesmo corte tecidual; a localização ultra-estrutural dos Ag pela compatibilidade com a ME. Mostraram ainda que alguns antígenos de membrana seriam melhor preservados em tecido fresco congelado.

ELIAS et al. (1989) realizaram uma ampla discussão sobre as principais normas de controle de qualidade das técnicas de IHQ e concluíram que o nível de controle alcançado estaria diretamente relacionado com o tamanho e diversidade da amostra dos tecidos normais e patológicos testados e com a experiência do investigador.

BRADLEY e MAYS (1990) realizaram a técnica de IP em 22 biópsias de pele canina fixadas em formalina e incluídas em parafina e obtiveram resultados positivos superiores aos conseguidos com a técnica de IF, na pesquisa de IgG, IgA e IgM em cães com doenças de pele auto-imunes. Referiram que o Ac anti-IgG provou ser o melhor reagente em todas as doenças analisadas (lúpus, pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar), porém resultados falso-negativos ainda foram um problema com a utilização desta técnica. Tentaram justificar esses resultados falso-negativos pela ação da fixação prolongada em formaldeído (maior de 24h), o que poderia formar ligações cruzadas de aldeído nos sítios antigênicos, ou ainda pela presença transitória das IG nas lesões de doenças auto-imunes.

TAYLOR (1992), em uma proposta de standardização das técnicas de IHQ apresentada no “*Annual Meeting of the Biological Stain Commission*”, realizado em Washington em junho de 1991, defendeu que estas técnicas eram uma parte estabelecida na prática diagnóstica, principalmente da patologia cirúrgica. Entretanto, estas mesmas técnicas não tinham sido submetidas a uma standardização similar àquela aplicada com os procedimentos de IF.

CATTORETTI et al. (1993) confirmaram que um número significativo de Ac, anteriormente considerados de utilização possível somente em material congelado, poderia atualmente ser aplicado em material fixado em formalina e incluído em parafina.

HAPPERFIELD et al. (1993) avaliaram 11 sistemas avidina-biotina-peroxidase (ABC) disponíveis no mercado para a coloração de cortes de amígdala e apêndice fixados em formalina e incluídos em parafina, na pesquisa de IG. Concluíram que as IG, tanto as intracelulares quanto as localizadas na zona do manto, puderam ser visualizadas nos tecidos parafinados com qualquer um dos sistemas testados. Os mais sensíveis foram os das marcas Dako, StABC e Vector Elite.

TAO et al. (1994) demonstraram a utilização de dupla coloração IHQ em cortes parafinados de linfoma, combinando a fosfatase alcalina com a IF, com sucesso.

COVENTRY et al. (1994) compararam o método de IP com a citometria de fluxo de alta sensibilidade para a análise de linfócitos e células amigdalinas e obtiveram resultados similares com ambos os métodos.

FROST et al. (1994) estudaram 150 amostras de tecidos neoplásicos fixados em formalina, álcool ou fixador B5 e incluídos em parafina pela técnica da IP e realizaram a análise por ME em 94% destes casos. Concluíram que a ME foi útil em 92% dos casos e a IHQ, em 73%, e que esta última foi particularmente útil nos casos de neoplasmas pobremente diferenciados, enquanto a primeira o foi na diferenciação dos carcinomas.

KONTOCHRISTOPOULOS et al. (1995) utilizaram a IHQ para o estudo da hanseníase do tipo históide e encontraram achados que suportariam a ocorrência de uma reação de hipersensibilidade celular modificada.

Já TEBBE et al. (1995) utilizaram a fosfatase alcalina no estudo imunohistoquímico em 18 biópsias de pele congeladas de pacientes com lúpus eritematoso. Empregaram um painel de anticorpos monoclonais para a identificação de antígenos leucocitários responsáveis pela adesão celular.

ZAENGLEIN, HAFER e HELM (1995) analisaram 13 biópsias de pele fixadas em formalina e incluídas em parafina de pacientes com diagnóstico de dermatite herpetiforme comprovado pela IF. Utilizaram o método avidina-biotina-peroxidase (ABC) e observaram que todos os que foram positivos pela IF também o foram pela IP. Um caso foi reclassificado como IgA linear e posteriormente confirmado em outro laboratório, e os 5 casos negativos pela IF também mostraram-se negativos pela IP. A biópsia do caso mais antigo datava de 1979 e não demonstrou perda da imunorreatividade.

WALLACE e SMOLLER (1996) realizaram uma ampla revisão sobre os métodos IHQ e salientaram o papel destas técnicas na diferenciação celular de tumores e infiltrados linfocitários, citando os principais antígenos disponíveis, entre eles: os marcadores de diferenciação epidérmica, os de diferenciação mesenquimal, marcadores neuro-ectodérmicos, neuro-endócrinos e hematopoiéticos.

GUEDES (1996) utilizou a técnica de IP nas mucosas e na pele de pacientes com pênfigo foliáceo endêmico, para a avaliação das células de Langerhans e para a

verificação da deposição do anticorpo 32-2B, específico para a desmogleína 1. As amostras analisadas pela IHQ foram fixadas em Bouin e incluídas em parafina e foram utilizados o método PAP para a identificação das células de Langerhans e o método ABC para a pesquisa da desmogleína 1.

3.3.4 Problemas Inerentes à Técnica de Imunoperoxidase

Coloração de fundo inespecífica pode ocorrer se houver absorção tecidual não-específica de proteínas séricas ou difusão extracelular de Ag (cortes mal congelados ou mal preparados. Este problema pode ser contornado pela inativação de proteínas estranhas ou pela titulação de todos os passos do procedimento de forma a alcançar as diluições que só detectem os Ac específicos (BEUTNER et al., 1975; HALE et al., 1975).

A visualização de Ag pelos procedimentos de IP depende do desenvolvimento de contraste entre a coloração do antígeno e o fundo. Coloração de fundo específica pode resultar da presença de Ag em concentrações variadas no material analisado. A difusão para fora da célula de Ag intracelulares no momento da fixação também pode contribuir para este tipo de coloração. Além disso, qualquer grau de infiltrado inflamatório, de necrose tecidual ou de autólise, pode produzir difusão do Ag (TAYLOR, CHIR E PHIL, 1978).

A peroxidase pode ocorrer naturalmente em tecidos, incluindo células vermelhas, leucócitos e peroxissomos do fígado, dificultando a análise dos depósitos. Além disso as pseudo-peroxidases, tais como a hemoglobina, podem também resultar em significativa coloração de fundo. A inativação da peroxidase endógena pela incubação com peróxido de hidrogênio e metanol e o uso de controles não expostos ao Ac primário permitem uma análise mais detalhada dos cortes (TAYLOR, CHIR E PHIL, 1978; HEYDERMAN, 1979).

A recuperação de sítios antigênicos anteriormente não identificados pela digestão enzimática pode trazer resultados benéficos. Mas os resultados nem sempre são previsíveis, principalmente na tentativa de se localizar IG de superfície ou

extracelulares, pois o próprio Ag é suscetível à ação das enzimas proteolíticas (SHEIBANI e TUBBS, 1984).

Apesar de os tecidos parafinados fornecerem excelente detalhe morfológico, ficou demonstrado que a fixação pode alterar a imunorreatividade de alguns antígenos como, por exemplo, as IG depositadas na pele e a avaliação das desordens renais e linfo-proliferativas (SHEIBANI e TUBBS, 1984; ELIAS et al., 1989).

3.4 MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

Vários fatores podem levar a resultados falso-negativos ou à inativação de sítios antigênicos. Foram revisados os principais métodos utilizados para melhorar a coloração imunoenzimática.

3.4.1 Agentes Fixadores

Alguns Ag podem ser destruídos pela fixação preferindo-se, neste casos, o congelamento à fixação em formalina, pois os cortes de criostato fornecem uma técnica mais sensível e reprodutível, principalmente na caracterização de IG de superfície, Ag de diferenciação linfocitária e IG extracelulares.

TAYLOR, CHIR e PHIL (1978) comentaram que a formalina a 10% seria o meio de fixação mais utilizado em histopatologia diagnóstica; entretanto, estudos preliminares de pesquisa de IG em cortes parafinados pela técnica de IP não haviam mostrado bons resultados, levantando a hipótese de que esta substância pudesse inativar a reação Ag/Ac. Nem todos os Ag manteriam suas propriedades após a fixação em formalina e inclusão em parafina e muitas moléculas de IG poderiam se difundir através dos cortes. Desta forma, os autores aconselharam a utilização de formalina pelo tempo mínimo para a obtenção de uma boa morfologia tecidual ou ainda a fixação em formalina tamponada.

CURRAN e GREGORY (1980) estudaram a deposição de IG em 26 cortes de amígdala e 42 cortes de medula óssea e demonstraram que a espessura dos cortes de material parafinado utilizados para a análise pela técnica de IP tinha influência considerável nos resultados desta análise. Já os vários passos do processamento do

tecido, bem como a testagem de vários tipos de fixadores, não pareceram alterar a imunorreatividade das amostras.

FARR e NAKANE (1981) referiram que a fixação seria um passo importante nos procedimentos de IHQ e que o fixador ideal deveria preencher alguns critérios como: preservar a morfologia tecidual, possibilitar que a distribuição do Ag refletisse confiavelmente a situação no estado não fixado, deixar o Ag a ser localizado acessível ao Ac marcado com a enzima e causar a mínima desnaturação do antígeno em estudo.

MATTHEWS (1981) estudou a influência dos agentes clareadores na determinação da imunorreatividade de Ag em tecido fixado em formalina e incluído em parafina e demonstrou o efeito deletério do xilol no processamento do tecido. Também obteve aumento da coloração após a utilização de digestão enzimática.

SHEIBANI e TUBBS (1984) relataram que os procedimentos de inclusão tinham efeito mínimo ou insignificante na imunorreatividade e que a espessura do fragmento e a rapidez de fixação é que seriam os fatores mais importantes na determinação de uma coloração adequada.

SATO et al. (1986) utilizaram um método de fixação em acetona a 20°C e tratamento com benzoato de metila e xilol (AMEX) antes da inclusão em parafina, conseguindo a localização de Ag que só tinham sido visualizados em material congelado.

ELIAS et al. (1989) concluíram que, se o tempo de fixação em formalina fosse muito curto, os tecidos seriam parcialmente fixados em álcool e parcialmente em formalina, de modo que a coloração poderia não se fazer na periferia ou só se fazer nesta região.

CATTORETTI et al. (1993) utilizaram vários tipos de tecido cortados ao meio e fixados em formalina tamponada a duas diferentes temperaturas: 4°C e à temperatura ambiente e a 3 tempos de fixação: 6 horas, 18 horas e 14 dias. Concluíram que o processamento do tecido e o tipo de fixador constituíam as maiores variáveis para o sucesso da coloração IHQ. Confirmaram que melhores resultados foram obtidos com tempos menores de fixação (< de 24h) e com temperaturas menores (4°C).

TAO et al. (1994) aplicaram uma técnica de dupla coloração IHQ (com fosfatase alcalina e fluoresceína) em cortes parafinados e congelados, com bons

resultados nos congelados, porém com autofluorescência importante quando utilizados aqueles fixados em formalina e incluídos em parafina.

BHAN (1995) referiu que os tecidos congelados deveriam ser empregados em situações em que os cortes parafinados não fornecessem boa preservação dos Ag e que as técnicas de IHQ seriam grandemente influenciadas pelo tipo de fixador utilizado. Ag pequenos (como os hormônios peptonídeos) seriam melhor imobilizados por fixadores capazes de formar ligações cruzadas, como o formaldeído e o glutaraldeído. Relatou que a utilização de fixadores contendo mercúrio poderia levar à precipitação de um material escuro nos tecidos. Defendeu ainda que o armazenamento de material fixado em formalina e incluído em parafina por um período prolongado poderia levar à perda da antigenicidade do tecido. Tal perda ocorreria também pela fixação prolongada em qualquer um dos fixadores devido à desnaturação progressiva dos Ag.

3.4.2 Tratamento Enzimático

HEYDERMAN (1979) descreveu que a utilização de enzimas teria algumas limitações, principalmente porque o tratamento era feito de forma subjetiva e existe a possibilidade de a clivagem enzimática poder fornecer fragmentos comuns a vários determinantes antigênicos.

MERA, YOUNG e BRADFIELD (1980) aplicaram a técnica de IF em material fixado em formalina e incluído em parafina, mostrando que a digestão enzimática foi importante na recuperação antigênica nos cortes parafinados e que a demonstração dos antígenos foi possível, embora o método tenha sido menos sensível nos cortes parafinados, quando comparados aos cortes de criostato.

HAUTZER, WITTKUHN e MCCAUGHEY (1980) analisaram material incluído em parafina de 20 linfomas malignos extranodais, 6 mielomas ou plasmocitomas e 4 linfonodos normais pela técnica de IP, utilizando a digestão com tripsina por um período de 2-4 horas. Identificaram a deposição de imunoglobulinas do tipo IgA, IgG, IgM, e cadeias κ e λ . As preparações não submetidas à digestão

enzimática foram difíceis de analisar ante a forte coloração de fundo ou fraca coloração específica e as tratadas com tripsina mostraram um aumento da coloração específica para as IG. Os achados confirmaram que as IG não seriam destruídas pela fixação em formalina e inclusão em parafina, mas tornadas temporariamente inacessíveis ou não-responsivas. Porém, o mecanismo de ação não foi acessado e apenas especulou-se que a tripsina recuperasse os Ag; aumentasse a permeabilidade das células e tecidos ou libertasse as moléculas antigênicas de possíveis ligações cruzadas.

PINKUS (1982) evidenciou que a digestão enzimática poderia diminuir a coloração de fundo e, desta forma, aumentar a sensibilidade da coloração de IP. Além disso, poderia melhorar a detecção de certos Ag em tecidos fixados em formalina.

TURBITT et al. (1982) utilizaram a técnica de IP na detecção de IG em doenças de pele auto-imunes e demonstraram que a tripsinização não resultou em maior positividade. Além disso, a utilização da digestão enzimática forneceu alguns resultados falso-positivos, pela identificação de alguns depósitos intercelulares.

SHEIBANI e TUBBS (1984) referiram que a recuperação antigênica com o uso de enzimas seria possível, mas os resultados obtidos poderiam ser imprevisíveis, o que aconteceria principalmente com as IG de superfície e IG extracelulares pois o próprio Ag seria suscetível à digestão enzimática.

CATTORETTI et al. (1993) utilizaram a digestão com tripsina (0,05% a 37°C) e pronase (0,05%, a 37°C por 4 a 8 minutos) e testaram sua ação em algumas enzimas endógenas. Não mostraram que a digestão prévia alterou a coloração destas enzimas, comprovando ainda que a digestão enzimática foi necessária com 41 Ac testados, mas observaram que o tempo de ação e a concentração da enzima foram parâmetros críticos. Concentrações baixas ou pouco tempo de tratamento foram inadequados para recuperar os Ag, enquanto a exposição prolongada reduziu a coloração. Concluíram que a digestão enzimática teria um limitado grau de efetividade em cortes parafinados, pois demonstraram que a digestão utilizando enzimas com

diferentes tecidos-alvo forneceu resultados semelhantes e que a atividade de enzimas endógenas permaneceu inalterada após a tripsinização.

NORTON (1993) descreveu que o mecanismo da recuperação dos Ag poderia ocorrer pela clivagem da estrutura polipeptídica, o que ocasionaria a ruptura das ligações protéicas cruzadas, revelando sítios antigênicos até então não expostos, geralmente encobertos pelo processo de fixação em formalina.

BHAN (1995) referiu que a perda da coloração nos tecidos fixados em formalina poderia ser restaurada parcialmente com a utilização de enzimas proteolíticas (tripsina, pronase e papaína). O mecanismo exato desta recuperação não estaria bem claro, mas poderia ocorrer pela dissociação das reações cruzadas das proteínas, formadas durante a fixação. Entretanto, alguns Ag também poderiam sofrer a ação proteolítica destas enzimas, o que levaria à perda de determinantes antigênicos. Além disso, o tratamento com enzimas levaria a uma maior taxa de descolamento dos cortes das lâminas.

Apesar de a introdução das técnicas de digestão enzimática ter sido um passo importante para a recuperação de alguns sítios antigênicos anteriormente ocultos pelas ligações protéicas, muitos antígenos não podem ser adequadamente demonstrados apenas com este tipo de tratamento.

3.4.3 Utilização de Microondas

A introdução do aquecimento por microondas tem auxiliado na recuperação de Ag, possibilitando a sua visualização mesmo sem a digestão enzimática e também o resgate dos sítios previamente não detectáveis.

CHIU e CHAN (1987) descreveram o aumento da antigenicidade pela secagem dos cortes em microondas antes da coloração imunoenzimática, de forma a garantir uma melhor aderência destes às lâminas

LEONG, MILIOS e DUNCIS (1988) utilizaram as microondas para a fixação dos tecidos e obtiveram uma preservação antigênica superior àquela

conseguida com a fixação habitual. Foram estudados 23 Ag e não foi necessária a digestão enzimática, a não ser para a pesquisa de citoqueratinas e desmina.

LEONG e MILIOS (1990) compararam a fixação em microondas com a obtida após imersão em formalina tamponada e concluíram que a coloração obtida foi comparável e que a intensidade da mesma foi maior após a fixação dos cortes em microondas. Referiram que a ação das microondas permanecia desconhecida e que a rápida oscilação das moléculas dipolares a 2,5 bilhões de ciclos por segundo resultaria na colisão molecular e poderia acelerar grandemente as reações químicas.

SHARMA, KAUFFMAN e MCGAUGHY (1990) testaram 47 Ac em cortes parafinados colados em lâminas de vidro, secos em microondas por 1 minuto à potência média ou pelo método habitual em forno simples a 58°C durante 1 hora. Obtiveram resultados semelhantes com os dois métodos e sugeriram que o calor gerado pelas microondas dissociaria as pontes de metileno nos tecidos fixados em formalina ou de algum outro modo que aumentaria a recuperação de sítios antigênicos produzida pela tripsinização.

SHI, KEY e KALRA (1991) mostraram que as soluções de metais pesados, tais como chumbo e zinco, em associação com as microondas, poderiam agir como precipitadoras de proteínas, formando complexos insolúveis com polipeptídeos e aumentando significativamente a imunorreatividade de vários antígenos. Os resultados foram ainda melhores com tecidos fixados em formalina por mais de 24 horas. Mostraram ainda que o aquecimento pelas microondas foi superior ao aquecimento convencional e à digestão enzimática na recuperação antigênica. O mecanismo exato pelo qual haveria o aumento da coloração seria desconhecido. Defenderam que apenas o aumento da agitação molecular ou da temperatura, determinada pelas ondas eletromagnéticas de alta frequência, poderia alterar a ligação cruzada de proteínas causada pelo formaldeído, expondo sítios antigênicos anteriormente não detectáveis.

SHIN et al. (1991) referiram que, durante a fixação do tecido em formalina, os grupos aldeído se ligariam aos grupos amina da cadeia polipeptídica e às cadeias laterais de aminoácidos, ocultando os sítios antigênicos. Pela utilização de um método

de secagem hidratada em autoclave após a desparafinização, demonstraram que, quando as proteínas estão hidratadas, a sua desnaturação é muito mais fácil. Já a proteína desidratada seria extremamente resistente à desnaturação pelo calor.

NORTON (1993) também referiu esta resistência das proteínas à desnaturação quando as mesmas estão desidratadas. Demonstrou ainda que os sais metálicos e a uréia poderiam desdobrar a estrutura terciária da proteína pela dissociação das ligações de hidrogênio.

CATTORETTI et al. (1993) citaram que as microondas poderiam afetar as proteínas tanto pelo aumento da agitação molecular quanto pelo aumento da sua temperatura, e seus dados sugeriram que o mecanismo de ação mais provável seria a desnaturação protéica causada pelas microondas.

CUEVAS et al. (1994) demonstraram recuperação antigênica em 20 dos 80 Ac testados em cortes fixados em formalina e incluídos em parafina, que tinham se mostrado negativos antes do aquecimento por microondas. Salientaram o número cada vez maior de Ag que pode ser recuperado nos cortes parafinados após o tratamento em microondas.

3.5 CONTROLE E ESTANDARDIZAÇÃO DAS TÉCNICAS

TAYLOR, CHIR e PHIL (1978) referiram que a qualidade do sistema de identificação de Ag estava diretamente relacionada à qualidade dos Ac utilizados. Destacaram que nenhum conjugado disponível no mercado era verdadeiramente monoespecífico e que as técnicas utilizadas para a detecção de IG de superfície eram consideravelmente mais sensíveis, podendo demonstrar a presença de substâncias indesejadas. Salientaram que todos os estudos de IHQ deveriam incluir controles positivos e negativos, de forma a otimizar a análise dos resultados obtidos.

HEYDERMAN (1979) criticou os trabalhos publicados que não explicitavam os controles de qualidade utilizados, a fim de provar que os depósitos visualizados eram específicos e não apenas algum Ag irrelevante ou contaminante. Salientou a importância da realização de controles de cada passo do procedimento de IHQ, desde controles de absorção, cromógeno, omissão de reagentes, utilização de

soro não imune, comparação com outros anti-soros, bloqueio com outros anti-soros, até a utilização de controles positivos com amostras de tecidos normais e neoplásicos.

FALINI e TAYLOR (1983), em uma ampla revisão sobre as técnicas de IP, defenderam que, na maioria das vezes, quando um novo estudo foi tentado e os resultados não foram adequados, não seria falha a técnica em si, mas o tipo de tecido utilizado, a forma e duração da fixação ou a escolha do Ac primário. Desta maneira, seria necessário primeiramente definir todas as necessidades do estudo, tipos de tecidos a serem analisados e reagentes disponíveis para uso, a fim de se fazer uma escolha racional da técnica a ser aplicada.

TAYLOR (1992) recordou os resultados dos grupos de estudo realizados em Washington em 1988 e 1989, quando um pequeno estudo de standardização das técnicas IHQ foi iniciado e resultou em diferenças significativas de sensibilidade e especificidade com apenas um Ac testado por 5 laboratórios independentes. Para alcançar uma coloração IHQ padrão, todos os reagentes incorporados na técnica deveriam ser submetidos a algum grau de padronização, o que incluiria não só o Ac, mas também as enzimas e os cromógenos.

BHAN (1995), em seu capítulo sobre a técnica de IP, afirmou que a seleção de uma técnica imuno-enzimática dependeria da amplificação da coloração necessária para demonstrar o Ag em estudo e da experiência do laboratório em utilizar as várias técnicas de IHQ.

3.6 DERMATOSES COM DEPOSIÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO

Há uma variedade de doenças caracterizadas pela deposição de imunoglobulinas e complemento na pele. A caracterização do tipo, do padrão e da localização destes depósitos fornece uma arma importante para a sua classificação e tratamento (TUFFANELLI, 1975; PROST, 1992; FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995). Entretanto, existem ainda algumas dermatoses inclassificáveis (CRICKX, 1985).

3.6.1 Grupo do Pênfigo

Inclui o pênfigo vulgar, pênfigo vegetante, pênfigo eritematoso e o pênfigo foliáceo.

O diagnóstico é baseado na presença de bolha intra-epidérmica com acantólise e a presença de auto-anticorpos reativos à substância intercelular, que reagem com Ag localizados precisamente nos sítios de lesão histológica primária e estão presentes em todas as formas de Pênfigo. No PF, a deposição geralmente ocorre nas camadas mais altas da epiderme (subcórnea), enquanto no PV, a deposição é mais baixa, na região suprabasal (BYSTRYN, ABEL e DEFEO, 1974; PROST, 1992).

BEUTNER e JORDON (1964) foram os primeiros a demonstrar a presença de anticorpos circulantes contra a substância intercelular no soro de pacientes com PV, com a utilização da técnica de imunofluorescência indireta.

BEUTNER et al. (1965) correlacionaram a presença destes Ac com a resposta da doença à administração de corticosteróides no pênfigo vulgar.

CHORZELSKI, WEISS e LEVER (1966) mostraram a diminuição dos títulos de Ac no soro de pacientes com pênfigo após o tratamento com corticóide e conseqüente melhora clínica.

WALDORF et al. (1966) obtiveram baixos títulos de reatividade em soros de pacientes com PV pela técnica de IFI, provavelmente devido à fluorescência não específica, autofluorescência, métodos de fixação, absorção e inclusão, características dos cortes teciduais e variações na especificidade e potência dos Ac.

BEUTNER, JORDON e CHORZELSKI (1968) fizeram uma ampla revisão sobre os achados imunopatológicos no pênfigo e penfigóide bolhoso, demonstrando os padrões de IF e sua importância.

CHORZELSKI e BEUTNER (1969) defenderam a presença de um amplo espectro de especificidades de Ac do pênfigo, o que explicaria a reação do soro de pacientes em alguns substratos e a não-reação em outros.

BEAN (1969) demonstrou a presença de anticorpos intercelulares contra o epitélio escamoso no fluido das bolhas e no soro de dois pacientes com pênfigo.

JORDON, TRIFTSHAUSER e SCHROETER (1971) demonstraram a deposição de IG (principalmente da classe IgG) e complemento no espaço intercelular da epiderme de pacientes com pêfigo.

BYSTRYN, ABEL e DEFEO (1974) demonstraram a ocorrência de Ac distintos no PF, localizados apenas na camada subcórnea e dirigidos à substância intercelular.

TUFFANELLI (1975), estudando o soro de 90 pacientes com PV, demonstrou 82,2% de positividade para estes Ac e referiu que a positividade foi maior com a utilização da IFD do que com a IFI.

SCHILTZ e MICHEL (1976) demonstraram que o soro de pacientes com pêfigo foi capaz de produzir acantólise em culturas de pele normal e que as frações IgG deste soro foram responsáveis pelo dano tissular.

TROST, STEIGLEDER e BODEUX (1980) realizaram estudos imuno-elétron-microscópicos com a utilização de proteína-A ligada à peroxidase para a detecção de Ac do Pêfigo.

HASHIMOTO et al. (1983) demonstraram que os Ac se ligariam a polipeptídeos associados aos desmossomos, os quais engatilhariam uma mensagem intracelular para induzir a liberação de proteases, principalmente o ativador do plasminogênio, pelos queratinócitos. Estas proteases então produziriam a acantólise.

KAWANA, GEOGHEGAN e JORDON (1985) apresentaram evidências de que a ativação do complemento também seria importante para a produção da acantólise.

CRICKX (1985) referiu que os estudos de IF poderiam distinguir os casos de pêfigo foliáceo de outras dermatoses que cursariam com acantólise, como o pêfigo familiar crônico benigno (Doença de Hailey-Hailey) e a doença de Grover.

JONES, YOKOO e GOLDMAN (1986) propuseram que os determinantes antigênicos dos desmossomos reconhecidos pelos auto-anticorpos pudessem ter um papel importante na adesão das células da epiderme. Além disso, os desmossomos presentes em diferentes tipos de epitélio seriam bioquimicamente distintos e a

composição dos componentes dos desmossomos poderia variar de célula para célula mesmo dentro de um mesmo tecido.

Atualmente, sabe-se que os Ac de pacientes com PF reconhecem o polipeptídeo de 160-kD, associado à desmogleína e os pacientes com PV, o polipeptídeo de 210-kD com cadeias de 130 e 80-kD, uma molécula de adesão cálcio-dependente associada aos desmossomas (YANCEY, 1994).

Na IFD são encontrados depósitos de IgG em 80 a 100% dos casos e de C3 em quase 100% das áreas com acantólise. Ocasionalmente pode-se encontrar deposição de IgM (FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.91).

3.6.2 Grupo dos Penfigóides

Inclui o penfigóide bolhoso, penfigóide cicatricial e o penfigóide localizado (Brunsting-Perry). A apresentação histológica típica é a de bolha subepidérmica com eosinófilos na epiderme e na derme.

JORDON et al. (1967) identificaram a presença de Ac circulantes contra a membrana basal apenas nos pacientes com PB e defenderam que a demonstração destes seria de grande valor para diferenciar esta de outras dermatoses bolhosas. Relataram ainda que a presença destes Ac pareceu coincidir com a atividade da doença na maioria dos casos estudados.

JORDON et al. (1967) e CHORZELSKI et al. (1968) mostraram positividade em 60 a 70% dos casos pela IFI.

JORDON et al. (1971) obtiveram depósitos de IgG pela IFD em 11, de 12 biópsias de pele de pacientes com PB. Pela IFI, dos 8 soros testados, todos foram positivos para IgG e em 2 foi também observada positividade para IgM e IgA.

ENG e MONCADA (1974) observaram positividade para IgG em 11, de 12 pacientes com PB pela IFD e em 100% dos casos houve deposição de C3.

BEAN (1974) analisou 12 pacientes com penfigóide cicatricial e destes, apenas 2 não apresentaram positividade para IgG pelos estudos com IFD. Além da IgG, 5 pacientes apresentaram depósitos de C3 e um de C3 e IgA.

TUFFANELLI (1975), na avaliação de 67 pacientes com penfigóide bolhoso, demonstrou a presença destes Ac em 89% dos casos. Na junção dermo-epidérmica, Ac circulantes foram observados em 72% dos pacientes.

O penfigóide cicatricial mostra resultados semelhantes na IFD, porém em geral não apresenta Ac circulantes (TUFFANELLI, 1975; CRICKX, 1985).

CRICKX (1985) ainda referiu a presença de uma faixa contínua e homogênea Ac IgG antimembrana basal em 100% dos casos de penfigóide bolhoso, associados à deposição de C3.

YANCEY (1994) observou que os Ac do PB reconhecem moléculas 230 e 180-kD, associadas aos hemidesmossomas nos queratinócitos basais.

WALEKIN, ALLEN e WOJNAROWSKA (1995) mostraram depósitos lineares de IgG, pela IF, na porção dérmica da pele de uma criança, separada por meio de solução salina. Estes achados sugeriram o diagnóstico de epidermólise bolhosa adquirida, porém a análise do soro pela técnica de *immunoblotting* mostrou resultados positivos com Ag de peso molecular de 220 e 180kD, compatível com o diagnóstico de PB.

O diagnóstico é realizado pelos estudos de IF. A IFD da pele peri-lesional demonstra depósito linear ou fibrilar de C3 ao longo da zona da membrana basal em quase 100% e de IgG em 90% dos casos. Com menor frequência pode ocorrer deposição de IgA, IgM, IgD e IgE (FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p. 91).

3.6.3 Herpes gestacional

Trata-se de uma doença bolhosa autolimitada, caracterizada por lesões vesico-bolhosas agrupadas, intensamente pruriginosas, em mulheres grávidas, geralmente no terceiro trimestre da gestação ou durante o pós-parto. A histologia

mostra bolha subepidérmica e pode haver infiltrado inflamatório perivascular e intersticial superficial e profundo nas lesões recentes.

KATZ, HERTZ e YAOITA (1976) demonstraram a presença de depósitos lineares densos de C3 na membrana e evidenciaram a presença de uma IgG chamada “fator herpes gestacional”. Esta IG seria um auto-anticorpo contra a membrana basal que fixaria o C3 avidamente e estaria presente no soro em quantidades tão pequenas que escapariam da detecção pela IFI, sendo detectada apenas pela reação de fixação do complemento.

CRICKX (1985) identificou que os depósitos de C3 nestes pacientes eram mais intensos e mais constantes do que os de IgG.

Apesar de o exame histológico demonstrar bolha subepidérmica, um estudo recente indicou que o sítio da formação da bolha era acima da lâmina densa, junto à lâmina lúcida (SMITH, TAYLOR e ZONE, 1992).

A IgG envolvida pertence à classe IgG1 (SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.93).

NIIMI, ZHU e BYSTRYN (1992) realizaram a técnica de IFI em pele separada com solução salina com o soro de pacientes com penfigóide cicatricial. Os Ac reagiram em todos os pacientes contra um Ag de 160-kD e, em um paciente, também contra um Ag de 230-kD. Esses Ag epidérmicos tinham peso molecular semelhante ao do Ag do penfigóide bolhoso, porém a frequência com que os depósitos ocorreram foram diferentes nas duas dermatoses.

NAGANO et al. (1994) analisaram uma criança com PB pela MO e ME e com as técnicas de IF, IP e *immunoblotting*. A IFD mostrou depósitos lineares de IgG e C3 na membrana basal e a IP associada à análise em ME confirmou a presença destes depósitos, localizando-os na porção superior da lâmina lúcida e na parte inferior dos queratinócitos basais. A avaliação por *immunoblotting* demonstrou reação com o polipeptídeo epidérmico de 180kD.

A IFD é o método diagnóstico mais confiável nesta dermatose. Ocorre deposição de C3 na zona da membrana basal em quase 100% dos casos e IgG em 30-50% deles. Na IFI com a utilização de uma fonte de complemento e um conjugado

anti-C3, detecta-se o fator herpes gestacional (fator HG) em 100% dos casos (FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.93).

3.6.4 Dermatose da IgA Linear

É uma doença bolhosa da pele, com manifestações clínicas semelhantes às do PB ou dermatite herpetiforme. Os dados histológicos incluem bolha subepidérmica com neutrófilos na junção dermo-epidérmica. Na criança ela é também chamada de doença bolhosa crônica da infância. O diagnóstico é definido pela presença de depósitos lineares de IgA na junção dermo-epidérmica.

CHORZELSKI e JABLONSKA (1979) encontraram depósitos lineares de IgA em crianças com diagnóstico de doença bolhosa crônica da infância e sugeriram que esta dermatose, que possui características tanto da dermatite herpetiforme quanto do PB, poderia ser considerada uma forma infantil da dermatose de IgA linear.

LEONARD et al. (1982), em um estudo multicêntrico, compararam 35 pacientes com dermatite herpetiforme e 42 com dermatose de IgA, sendo que, destes, 34 apresentavam depósitos de padrão linear homogêneo e 8, depósitos de padrão linear granular. Concluíram que estudos subseqüentes analisando a localização ultra-estrutural dos depósitos de IgA, bem como a resposta dos pacientes a uma dieta sem glúten, deveriam auxiliar na identificação de subgrupos.

BHOGAL et al. (1987) fizeram um estudo ultra-estrutural de 31 pacientes com dermatose de IgA linear e observaram que em todos eles a IgA estava localizada predominantemente abaixo da lâmina lúcida.

WOJNAROWSKA, BHOGAL e BLACK (1994) identificaram que a IgA depositada na junção dermo-epidérmica dos pacientes com a doença de IgA linear era uma IgA da subclasse 1.

ZIVONY e COHEN (1994) descreveram uma criança com doença bolhosa crônica da infância e demonstraram a deposição linear de IgA na zona da membrana basal pela IFD. Chamaram a atenção para a falta de comprometimento intestinal nesta dermatose, o que a diferencia da dermatite herpetiforme.

YARDY e LIM (1994) citaram a alta incidência de antígenos de histocompatibilidade HLA-B8 (76%) na doença bolhosa crônica da infância e a importância dos estudos de IF para a diferenciação diagnóstica desta dermatose com a dermatite herpetiforme, o PB e o penfigóide cicatricial.

KANITAKIS et al. (1994) realizaram a técnica de IF em pele separada com solução salina de uma criança com dermatose de IgA linear, demonstrando o padrão característico de deposição linear na junção dermo-epidérmica. Pela análise com Western-blot, o lado epidérmico do corte de pele reagiu com um Ag epidérmico de 230 kD, como os encontrados nos casos de penfigóide bolhoso.

TSE e LIM (1994) salientaram que a IF era um método importante na diferenciação entre a doença bolhosa crônica da infância e outras doenças bolhosas.

COLLIER, KELLY e WOJNAROWSKA (1994) observaram que 12 pacientes grávidas com doença de IgA linear mostraram melhora em seu quadro clínico, e sugeriram que as alterações na glicosilação da IgA seriam a causa desta melhora.

HAFTEK et al. (1994) utilizaram a marcação ultra-estrutural com ouro e a técnica de *immunoblotting* e notaram que os Ac que reconheciam o Ag 97-kD se ligavam às placas hemi-desmossômicas dos queratinócitos basais e da lâmina lúcida adjacente.

A IFD da pele peri-lesional mostra depósitos lineares de IgA na membrana basal em 100% dos casos e depósitos lineares de C3 em 20 a 25% dos casos. IgG e IgM são encontrados ocasionalmente. A imuno-elétron-microscopia mostra que os imunorreagentes podem se localizar em 3 padrões: na lâmina lúcida, sob a lâmina densa ou em ambos os locais (FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995).

3.6.5 Dermatite Herpetiforme

É uma doença sistêmica com manifestações cutâneas, com comprometimento intestinal, manifestado por uma enteropatia glúten-sensível. Os achados histopatológicos incluem uma bolha subepidérmica com neutrófilos nas pontas das papilas dérmicas.

VAN DER MEER (1969) realizou um estudo de IF em biópsias de pele para diferenciar os casos de penfigóide bolhoso dos casos de dermatite herpetiforme e seus resultados demonstraram a presença de depósitos granulares de imunoglobulinas na junção dermo-epidérmica, principalmente na ponta das papilas da pele peri-lesional dos pacientes com dermatite herpetiforme. Já os casos de penfigóide demonstraram um padrão de fluorescência homogêneo, na pele peri-lesional e normal, bem como a presença de Ac circulantes em todos os casos. Entretanto, não se identificou a presença de Ac séricos contra a membrana basal nos pacientes com dermatite herpetiforme.

FRASER (1970) realizou um estudo de determinação da presença de auto-anticorpos tireoidianos e gástricos em 43 pacientes com dermatite herpetiforme. Demonstrou uma incidência aumentada destes, o que poderia indicar que a erupção cutânea era devida a uma reação imune.

FRY e SEAH (1974) analisaram 42 pacientes com diagnóstico clínico de dermatite herpetiforme e observaram depósitos granulares de IgA pela técnica de IF na pele não lesional de 35 deles. Destes, 34 apresentavam evidências de enteropatia.

Em outro artigo, SEAH e FRY (1975) observaram 50 pacientes com dermatite herpetiforme e notaram que dois deles apresentavam uma primeira biópsia negativa para IgA, enfatizando que a biópsia deveria ser repetida quando houvesse forte suspeita clínica. Concluíram que a detecção de IgA na pele não lesada era o teste mais simples e confiável para se estabelecer este diagnóstico.

LEONARD et al. (1983) salientaram que a causa da dermatite herpetiforme era a sensibilidade ao glúten. O mecanismo pelo qual o glúten seria capaz de provocar as lesões ainda não foi completamente elucidado. A ingestão de glúten levaria a alterações no intestino e à produção de Ac específicos para esta substância. Além disso, parece ocorrer uma predisposição genética para a doença.

CRICKX (1985) demonstrou depósito de IgA de aspecto linear na membrana basal em 20% dos pacientes com dermatite herpetiforme.

EGELRUD e BÄCK (1985) utilizaram a digestão péptica da derme papilar para tornar os depósitos de IgA acessíveis à análise bioquímica e imunoquímica.

MEYER, CARIOTO e ZONE (1987) descreveram um método imunoenzimático simples para a identificação de imunocomplexos na pele de pacientes com dermatite herpetiforme, sem a necessidade da digestão enzimática e que minimizaria as concentrações de IgA contaminante.

SMITH, TAYLOR e ZONE (1992) identificaram que o sítio de formação da bolha na dermatite herpetiforme era na lâmina lúcida, com estudos de IFD e pesquisa de Ac contra o penfigóide bolhoso, a lamnina, o colágeno tipo IV e a epidermólise bolhosa adquirida.

Os estudos de IF são importantes na confirmação diagnóstica. A IFD da pele peri-lesional ou normal revela depósitos granulares de IgA na derme papilar em 100% dos casos. Estes depósitos podem ser focais, por isso devem ser examinados vários locais. Depósitos de C3 estão presentes em 70% e IgG, IgM, IgD e IgE também podem ser encontradas ocasionalmente (FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.92).

3.6.6 Grupo das Vasculites

STRINGA, BIANCHI e ZINGALE (1966) demonstraram deposição de IG e complemento no tecido de pacientes com vasculite nodular, sugerindo um provável mecanismo imuno-alérgico para esta doença.

PARISH e RHODES (1967) examinaram 9 biópsias de pele de pacientes com vasculite nodular pela técnica de IF na procura de globulina nativa, e antígenos estreptocócico e da tuberculose. Encontraram antígenos contra *Mycobacterium tuberculosis* em dois e polissacarídeo de estreptococo grupo A em um. Levantaram a hipótese de que outras formas de vasculite, como a poliarterite nodosa, o eritema multiforme, o eritema nodoso e as paniculites, também poderiam resultar da deposição de complexos Ag-Ac.

PARISH (1972) realizou estudos de IF em vários casos de vasculite e concluiu que alguns deles pareciam ser induzidos por complexos entre Ag bacterianos e Ac.

TUFFANELLI (1975) encontrou resultados positivos para IgG em 25 dos 35 pacientes biopsiados com vasculite necrotizante, IgM em 12, C3 em 15 e fibrina em 30.

BAART DE LA FAILLE – KUYPER et al. (1973) estudaram pacientes com púrpura de Henoch-Schönlein (PHS) e outras nefropatias, pela técnica da IF. Estes autores observaram deposição de IgA na parede dos capilares e no mesângio.

BAART DE LA FAILLE – KUYPER et al. (1974) demonstraram a existência de depósitos de IgA e complemento em todas as 13 biópsias de pele lesional obtidas de pacientes com PHS e defenderam que os estudos de IF poderiam ser úteis no diagnóstico desta dermatose. Em outro estudo, BAART DE LA FAILLE - KUYPER e BAART DE LA FAILLE (1974) observaram C3 e C5 nos vasos, sugerindo um mecanismo de ativação da via alternada do complemento.

O papel da imunofluorescência na avaliação das vasculites é controverso. Há deposição de IgM e C3 nas paredes dos vasos da maioria das vasculítes, no início de sua inflamação. Entretanto, alguns autores defendem que estes achados não são específicos das vasculites e poderiam ser vistos em várias condições que cursam com injúria vascular. Na PHS, o depósito predominante é de IgA granular na parede dos vasos e pode ser visto C3. É importante analisar a pele perilesional, pois a área lesada pode mostrar uma mistura de imunorreagentes secundária à injúria vascular. Além disso, as lesões devem ser recentes (menos de 18 horas). Nas vasculites leucocitoclásicas, os depósitos predominantes são de IgM e C3 na parede dos vasos. Na crioglobulinemia prevalecem C3 e IgG; nas vasculites necrotizantes, C3 e, ocasionalmente, IgM e IgA; e nas colagenoses, IgG, IgM e C3 (JORDON, 1980; FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.94).

3.6.7 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O teste da banda lúpica foi primeiramente descrito por BURNHAM, NEBLETT e FINE (1963). Neste estudo, uma banda de imunoglobulinas foi localizada na junção dermo-epidérmica em lesões de pele de pacientes com lúpus, mais evidente do que a visualizada em outras dermatoses.

KALSBECK e CORMANE (1964) demonstraram que certos pacientes com LES tinham uma banda de imunoglobulinas na junção dermo-epidérmica na pele visivelmente normal. Subseqüentemente, vários investigadores examinaram não somente o tipo de banda, mas também a incidência de banda em pele exposta ou não ao sol e sua correlação com o diagnóstico de Lúpus, assim como sua atividade e prognóstico.

BENSON e COHEN (1970) utilizaram o método de IP para a detecção de Ac antinucleares no soro de pacientes com LES, artrite reumatóide e esclerose sistêmica. Demonstraram uma boa correlação entre os resultados obtidos pelo método de IP quando comparado ao método de IF, com as vantagens da reprodutibilidade da técnica, facilidade de estandardização, ausência de coloração não específica e uso de microscópio óptico comum.

BURNHAM, FINE e NEBLETT (1970) defenderam o uso do teste da banda lúpica para o diagnóstico precoce do lúpus eritematoso, principalmente em pacientes com lesões não diagnosticadas pela análise histopatológica habitual.

Em outro estudo, BURNHAM e FINE (1971) demonstraram que a presença de um teste da banda lúpica positivo em pele normal é de grande valor para a confirmação do diagnóstico clínico de LES, mesmo sem lesões de pele ativas.

LANDRY e SAMS JR. (1973) pesquisaram a pele normal de pacientes com LES com o intuito de determinar se os Ac demonstráveis pela IFD na pele eram similares àqueles encontrados em outras estruturas e sugeriram que o mesmo processo imune poderia estar ocorrendo na pele e no rim.

TUFFANELLI (1975) encontrou resultados positivos para a deposição de IgG na pele lesada em 94% dos 189 pacientes com LES. Na pele sã, este resultado baixou para 49%, dos 193 pacientes analisados. O autor afirmou que os estudos de IF eram mais sensíveis e mais específicos do que a histologia normal para a diferenciação entre o lúpus e outras dermatoses, principalmente naqueles pacientes sem lesões de pele.

TEBBE et al. (1995) estudaram casos de lúpus discóide crônico e lúpus eritematoso cutâneo subagudo pelo método IHQ da fosfatase alcalina. Não demonstraram diferenças quantitativas entre ambas as formas, sugerindo que ambos pudessem ser espectros de uma mesma doença e não entidades patogênicas distintas.

GEORGE et al. (1996) avaliaram 5 biópsias de pele de crianças com LED pela IFD e obtiveram resultados fracamente positivos para IgG e IgM em três, fortemente positivos para IgM, IgG, IgA e C3 em um e negativos em um. Concluíram que os achados histológicos e de IFD no LED são semelhantes aos encontrados em adultos.

No lúpus, as IG estão dirigidas contra os componentes nucleares e da membrana basal. Podem ocorrer depósitos de IgG, IgM, IgA e C3, sendo os mais freqüentes os de IgG e IgM (FLOTTE, MARGOLIS E MIHM, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.93).

3.6.8 Eritema Multiforme

Este processo de doença parece representar uma condição inflamatória com uma ampla variedade de manifestações clínicas. Pode estar associado a uma série de fatores etiológicos, tais como agentes infecciosos, medicamentos etc. Histologicamente, caracteriza-se pela formação de bolha subepidérmica, necrose da epiderme e vasculite linfocítica. Observou-se deposição de IgM e C3 nas paredes dos vasos, na base da bolha e na derme papilar, mas seu papel na fisiopatologia desta entidade permanece controverso (JORDON, 1980; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.186).

3.6.9 Líquen Plano

WAISMAN, DUNDON e MICHEL (1973) referiram que a presença de aglomerados subepidérmicos de IG e complemento na junção dermo-epidérmica era útil no diagnóstico de LP, porém estes depósitos não eram específicos. Não conseguiram esclarecer se estes depósitos eram auto-anticorpos verdadeiros ou apenas ligações secundárias inespecíficas devidas à alteração estrutural destas células epiteliais danificadas. Esses autores não conseguiram demonstrar estes depósitos em casos de líquen nítido.

BAART DE LA FAILLE - KUYPER e BAART DE LA FAILLE (1974) referiram que o fator etiológico principal do líquen plano parecia ser o dano da

epiderme, com a formação de corpos colóides. Existiria concomitante ativação do complemento e permaneceria a dúvida se esta seria a causa ou a consequência da patologia epidérmica. Esses autores demonstraram IgM e fibrina em todos os 40 casos de líquen plano analisados.

A IF mostra a presença de corpos citóides fluorescentes com IgM e, menos freqüentemente, com IgA e IgG. Pode ocorrer depósito granular de IgM na zona da membrana basal, porém estes achados não são específicos do líquen, podendo ocorrer em outras dermatoses (SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.94).

Incluíram-se aqui as principais dermatoses auto-imunes, e estas foram subdivididas em grupos e caracterizadas quanto aos achados imunopatológicos mais freqüentes. Um resumo da localização, do tipo e da freqüência dos depósitos pode ser observado no quadro 1.

QUADRO 1 - TIPO, LOCALIZAÇÃO E FREQUÊNCIA DOS DEPÓSITOS NAS PRINCIPAIS DERMATOSSES AUTOIMUNES

DOENÇA	LOCALIZAÇÃO	IgG	IgM	IgA	C3
Pênfigo	intercelular	80-100%	25-50%		80-100%
Penfigóide	MB	90%	ocasional	ocasional	100%
Herpes gestacional	MB	30-50%			100%
IgA linear	MB	ocasional	ocasional	100% (linear)	20-25%
D. herpetiforme	derme	ocasional	ocasional	100% (granular)	70%
Vasculites	vasos	Cr, C	VL, VN, C	PHS, VN	PHS, VL, Cr, VN, C
Lúpus	MB, vasos	70-90%	70-90%	menos freqüente	menos freqüente
Eritema multiforme	derme, vasos		ocasional		ocasional
Líquen plano	MB		ocasional		
	Corpos citóides	ocasional	mais freqüente	ocasional	

NOTA: MB - zona da membrana basal

Cr - crioglobulinemia

C - colagenoses

VL - vasculite leucocitoclásica

VN - vasculite necrotizante

PHS - Púrpura de Henoch-Schönlein

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este é um estudo descritivo e retrospectivo, tendo sido submetido e aprovado pela Comissão de Ética Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná em 30 de julho de 1996.

4.1 SELEÇÃO DOS CASOS

Os pacientes submetidos à biópsia foram atendidos nos Ambulatórios de Dermatologia e Dermatopediatria do Hospital de Clínicas da UFPR. Inicialmente foram selecionados todos os pacientes cuja doença básica poderia estar associada à deposição de imunoglobulinas e complemento, tais como os portadores de doenças bolhosas auto-imunes, lúpus eritematoso e vasculite leucocitoclásica. Além destes, foram avaliados pacientes com outras dermatoses, cujas biópsias de pele poderiam ser utilizadas como controles negativos. Os diagnósticos foram efetuados correlacionando-se os dados clínicos, os achados histopatológicos e os resultados da imunofluorescência direta.

Inicialmente, foram revisados os prontuários de 186 pacientes, analisando-se os achados clínicos e o diagnóstico inicial. Destes 186 pacientes, 110 foram submetidos a biópsias cutâneas com estudo anátomo-patológico rotineiro. Dos 110 pacientes biopsiados, 81 também tiveram complementação diagnóstica com estudo por imunofluorescência direta, conforme o livro de registros da Seção de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica. Após a análise dos diagnósticos clínicos, histopatológicos e dos resultados da IFD, foram selecionados os 40 casos representativos que fazem parte deste estudo.

Os critérios de exclusão utilizados foram: resultados de IFD inespecíficos ou incompletos, impossibilidade de leitura pela IFD devido à conservação inadequada do material e impossibilidade de realização da técnica da imunoperoxidase pela escassez de material remanescente nos blocos de parafina arquivados.

4.2 HISTOTÉCNICA

Os fragmentos de pele encaminhados ao Laboratório de Anatomia Patológica foram submetidos à técnica histológica rotineira, com inclusão em parafina, microtomia a 4 µm e colorações pelas técnicas da hematoxilina e eosina e do PAS com digestão (PROPHT et al., 1994).

4.2.1 Imunofluorescência Direta

A técnica utilizada para a imunofluorescência direta foi a aplicada rotineiramente no Setor de Imunopatologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR (SAP).

Os fragmentos de pele foram coletados por meio de biópsia com *punch* ou bisturi, em centro cirúrgico, e mantidos imersos em meio de transporte (soro fisiológico à temperatura de 4°C) por não mais que 20 minutos, até o encaminhamento dos mesmos à Seção de Imunopatologia (SIP). Imediatamente o material foi imerso em gel crioprotetor (OCT Compound, Tissue-Tek, Miles Inc.-Diagnostic Division, Elkhart, IN, USA) e congelado em nitrogênio líquido, sendo conservado em *freezer* à temperatura de -80°C. Para a criotomia foi utilizado criostato International - Harris (International Equipment Company, Needham Heights, MASS, USA). Os cortes foram efetuados à espessura de 5 µm, e coletados em lâminas de vidro limpas, cinco cortes em cada lâmina. O material foi seco ao ar e submetido à imunocoloração.

Inicialmente os cortes foram submetidos a três banhos sucessivos em solução de tampão fosfato 0,01M, pH 7,2 (STF), com duração de 10 minutos cada. Em seguida, os mesmos foram incubados com anticorpos conjugados com fluoresceína, à temperatura ambiente, por 30 minutos, em câmara úmida. Os anticorpos utilizados foram: anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, e anti-C3 (Dakopats, Carpinteria, CA, USA). Após a imunocoloração os cortes foram imersos em três banhos sucessivos em STF, de 10 minutos cada. O material foi então contracorado com azul de Evans a 1% em STF, montado com lamínulas, utilizando-se glicerina tamponada, e analisado em microscópio de imunofluorescência Carl-Zeiss NT6 (Carl-Zeiss, West Germany).

As diluições adequadas foram definidas na aquisição do lote de anticorpos, utilizando-se as diluições preconizadas pelo fabricante e testando-se diluições acima e abaixo destas, a fim de se conseguir a melhor visualização dos depósitos com o mínimo de coloração de fundo. Para os controles positivos foram utilizados fragmentos de pele ou rim e para os controles negativos foi feita a substituição do anticorpo primário por STF.

Os resultados foram considerados positivos ou negativos, respectivamente, com a presença ou ausência de fluorescência e os depósitos foram classificados, conforme sua localização, em intercelulares, na zona de membrana basal, subepidérmicos ou perivasculares.

4.2.2 Imuno-Histoquímica

As amostras de pele submetidas a processamento histológico rotineiro e mantidas incluídas em parafina foram resgatadas do arquivo de blocos de parafina do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR para serem utilizadas na técnica de imuno-histoquímica.

A técnica utilizada foi a da imunoperoxidase, método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), conforme descrito por HSU, RAINE e FANGER (1981). Cortes seriados de 3 μ m, montados em lâminas de vidro tratadas com Poly-L-Lysine Hydromide (Sigma Chemical Company, P1274, St. Louis, MO, USA) foram utilizados para a imunorreação. O material foi desparafinado em xilol, e, após banhos sucessivos em álcool, foi hidratado em água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol por 30 minutos e, a seguir, o material foi imerso em banhos sequenciais de água destilada e STF por 2 minutos cada. O material foi então submetido à digestão enzimática com tripsina a 0,1% (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) diluída em STF por 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Em seguida, o material foi imerso em STF e os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se com soro não imune por 30 minutos. Os cortes histológicos foram então incubados com os anticorpos primários *overnight* em câmara úmida à temperatura de 4°C.

Os anticorpos primários utilizados foram: rabbit anti-human IgA (A 408), rabbit anti-human IgG (A 407), rabbit anti-human IgM (A 409), e rabbit anti-human

C3 (A 062) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). As diluições utilizadas foram de 1:20 para anti-IgA, 1:100 para anti-IgG e anti-IgM, e 1:50 para anti-C3. Os cortes foram então tratados com anticorpo secundário biotinizado (biotin-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) e, em seguida, incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABCComplex/HRP, K 377, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). A 3,3'-Diaminobenzidina (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) foi utilizada como cromógeno e as seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. Para os controles positivos foram utilizadas amostras de amígdalas humanas e para os controles negativos os anticorpos primários foram substituídos por soro não imune.

Para cada anticorpo primário utilizado, foi considerada imunorreação positiva quando obtida a coloração marrom escura, com as distribuições intra-epitelial (intercelular) (figura 1), na zona da membrana basal (figura 2), subepidérmica (figura 3) e perivascular (figura 4), isoladas ou associadas. Coloração marrom mais clara ou igual à coloração de fundo foi considerada negativa ou inespecífica.

Estes achados imuno-histoquímicos foram então comparados aos resultados obtidos pela IFD.

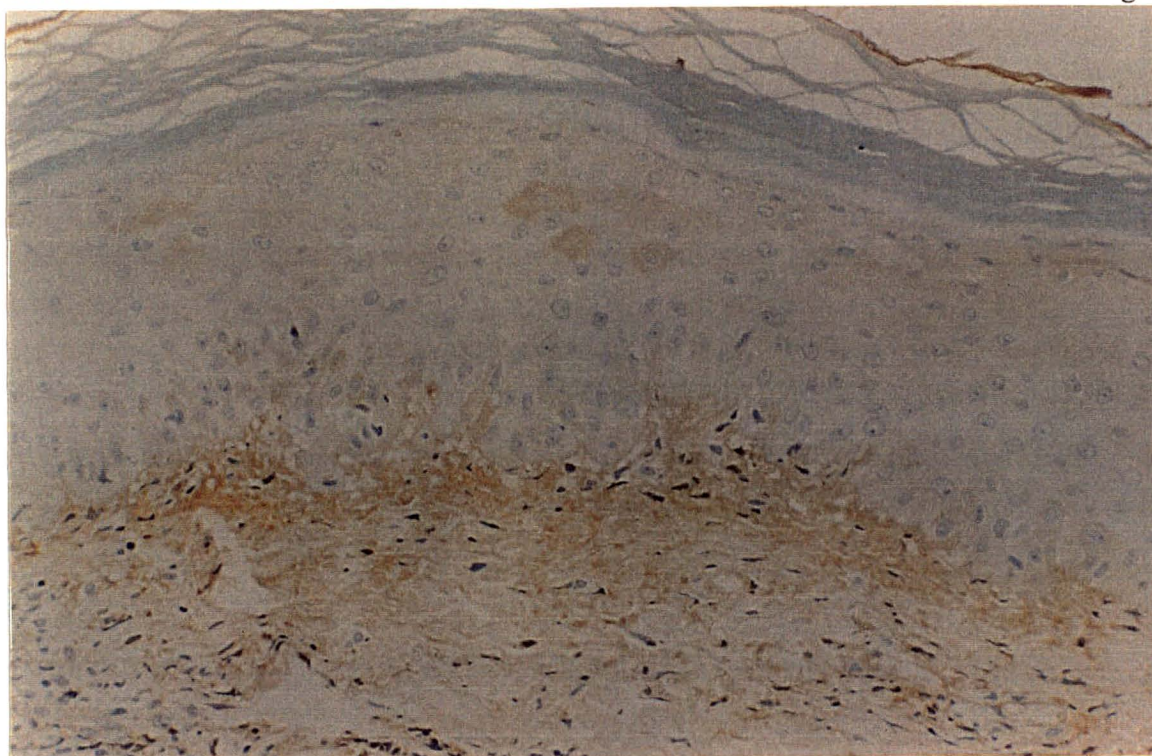
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente realizou-se um estudo descritivo das freqüências de resultados positivos e negativos observados pelos dois métodos de marcação com os diferentes anticorpos (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM e anti-C3). O instrumento utilizado foi a tabela de contingência (dupla entrada), que apresenta resultados relativos aos cruzamentos dos dados encontrados com as duas técnicas estudadas. Estas tabelas forneceram as freqüências necessárias para a aplicação de testes não paramétricos que permitiram a comparação entre os dois métodos.

Para comparar a presença de depósitos imunes nos dois métodos, aplicou-se o teste para amostras pareadas de McNemar. Para a comparação entre os dois métodos com relação à localização do depósito, calculou-se o coeficiente de contingência C, com a comprovação da significância estatística (verificação da significância da associação)

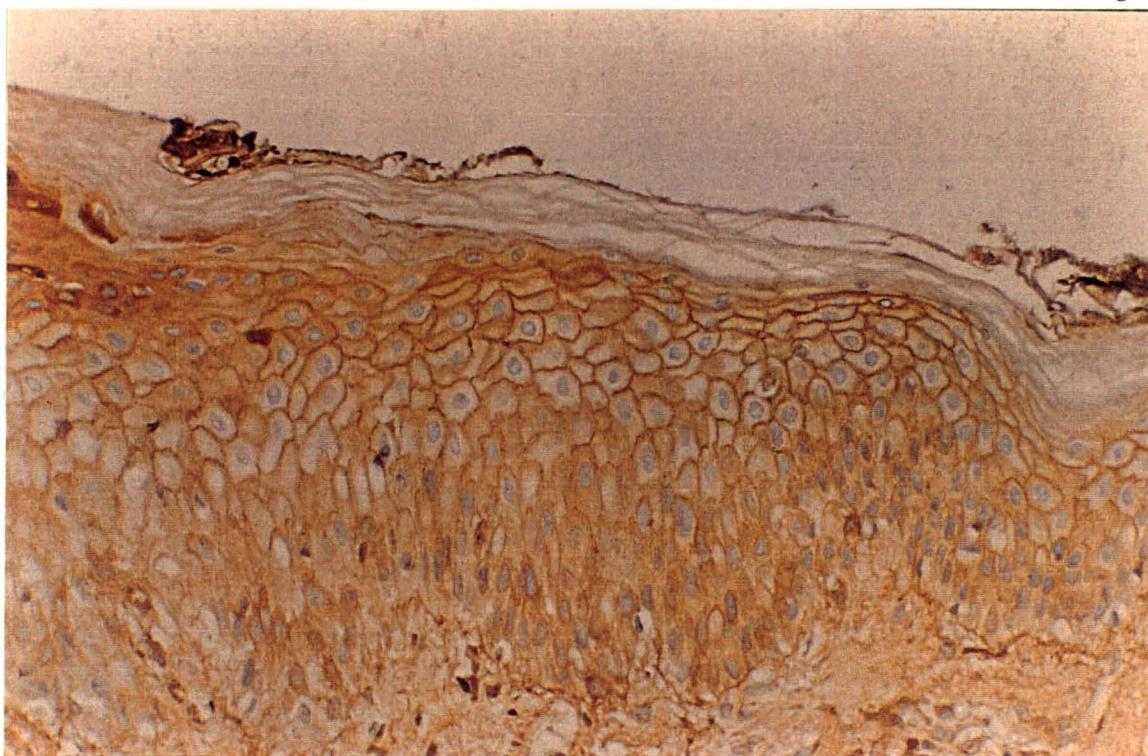
feita pelo teste Qui-quadrado de Pearson (SIEGEL e CASTELLAN, 1956; CAMPOS, 1983).

FIGURA 1 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgA



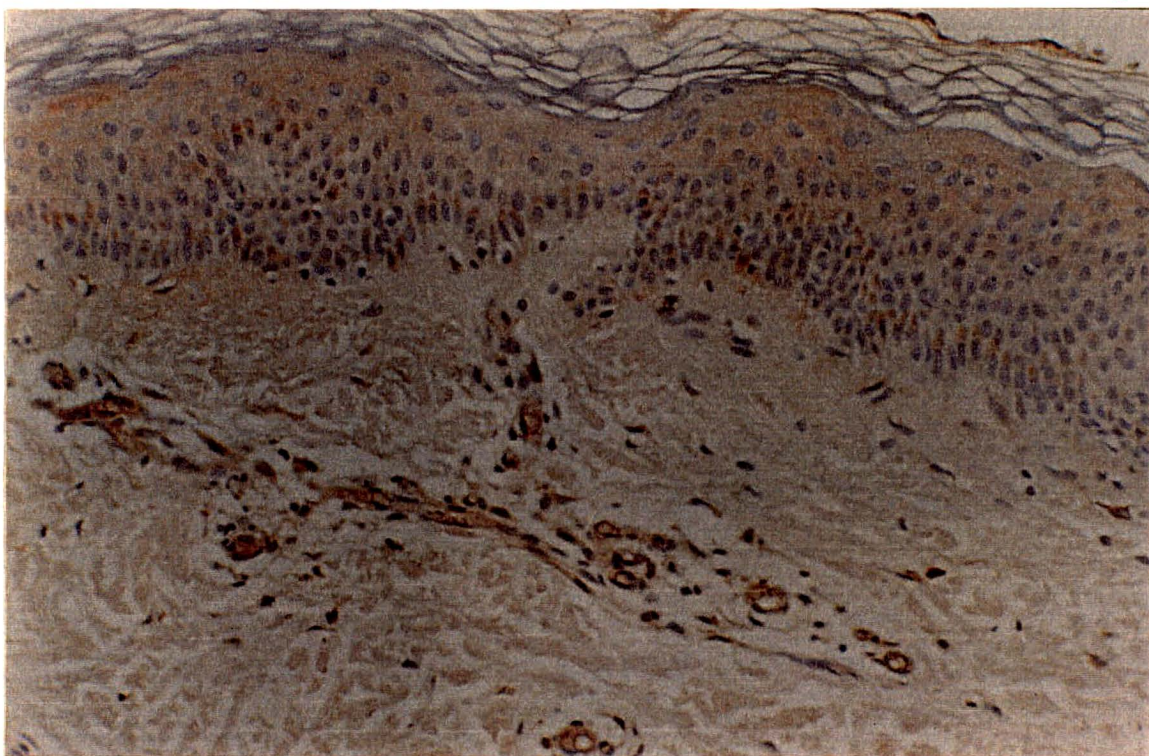
Região subepidérmica acastanhada, representando a deposição subepitelial da imunoglobulina em um caso de lúpus eritematoso (200X)

FIGURA 2 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgG



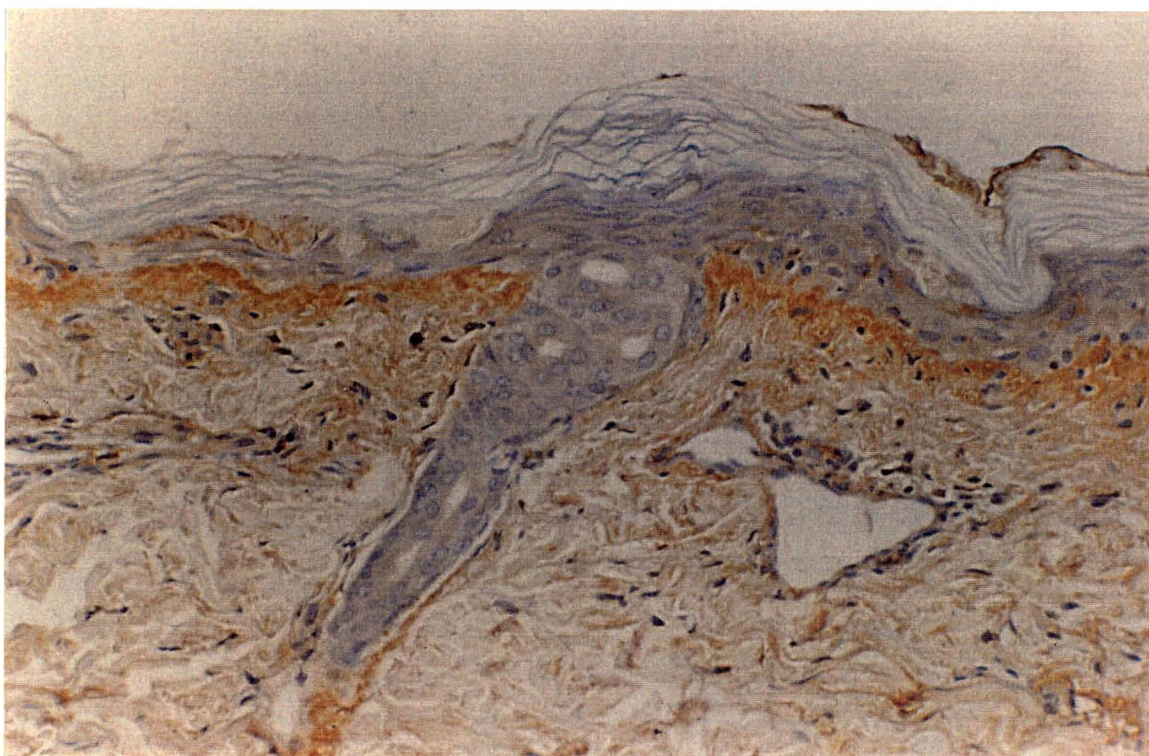
Observam-se espaços intercelulares de coloração castanha, representando deposição intercelular da imunoglobulina, em um caso de pênfigo vulgar (200X)

FIGURA 3 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgM



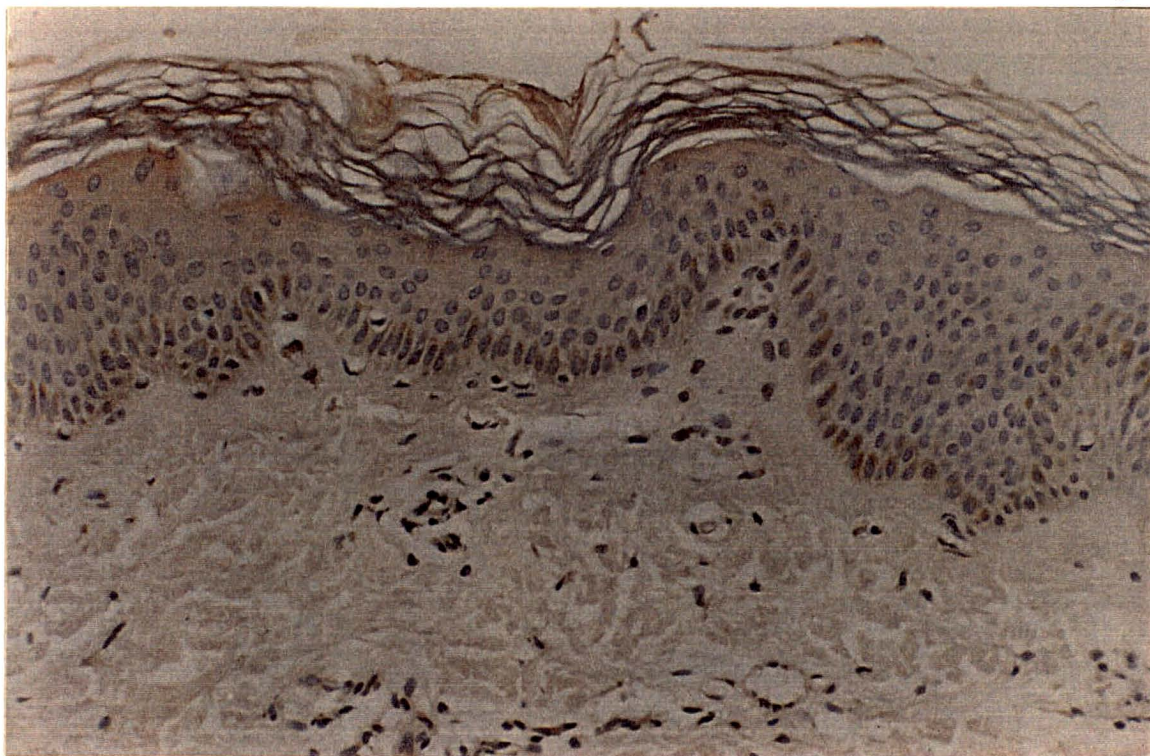
Observa-se parede vascular na derme de coloração acastanhada, representando a deposição na parede vascular em um caso de vasculite (200X)

FIGURA 4 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP –ANTICORPO ANTI-C3



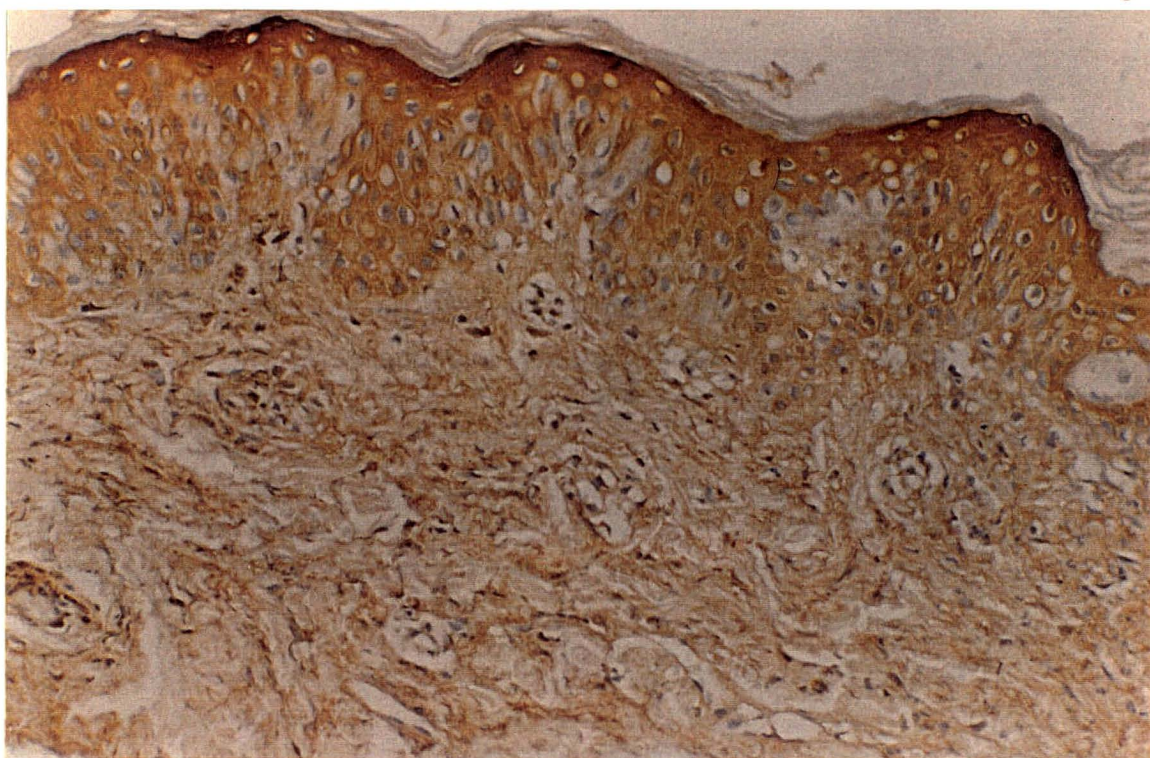
Observa-se zona da membrana basal de coloração acastanhada, representando a deposição a este nível em um caso de lúpus eritematoso (200X)

FIGURA 5 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgA



Nota-se ausência de áreas acastanhadas, observando-se apenas a coloração de fundo pela hematoxilina, representando imunocoloração negativa

FIGURA 6 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE CORADO PELA IP – ANTICORPO ANTI-IgG



Nota-se que todo o fragmento adquiriu coloração acastanhada difusa, sem nenhuma área de maior contraste, representando coloração inespecífica (200X)

5 RESULTADOS

5.1 DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Após a revisão dos prontuários e a avaliação do material de biópsia corado pela hematoxilina-eosina, foram obtidos os diagnósticos clínicos e histopatológicos dos 40 pacientes analisados neste estudo (tabela 1).

TABELA 1 - DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES ANALISADOS

Nº	INICIAIS	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO
1	EMP	Dermatite herpetiforme	Bolha subepidérmica
2	AT	Vasculite	Achados inespecíficos
3	JPS	Acropustulose	Dermatite espongíotica
4	RLS	Dermatite herpetiforme	Bolha intra-epidérmica
5	TOJ	Vasculite	Vasculite
6	EC	Eritema multiforme	Eritema multiforme
7	ZSA	Líquen plano bolhoso	Líquen plano
8	RN	Lúpus	Achados inespecíficos
9	CSS	Vasculite	Vasculite
10	MCR	Lúpus	Bolha subepidérmica
11	VLF	Herpes gestacional	Bolha subepidérmica
12	LML	Rosácea	Achados inespecíficos
13	VLF	Prurigo	Bolha subepidérmica em reepitelização
14	CMSS	Lúpus	Lúpus
15	DS	Lúpus discóide	Lúpus
16	CM	Eritema polimorfo à luz	Elastose, compatível com EPL
17	AKO	Prurigo	Prurigo
18	TPX	Lúpus discóide	Lúpus
19	SJG	Lúpus	Lúpus
20	NBSL	Líquen plano	Compatível com líquen
21	AW	Dermatite liquenóide a droga	Dermatite liquenóide
22	CPS	Dermatite herpetiforme	Bolha intra-epidérmica
23	PSS	Pênfigo foliáceo	Pênfigo foliáceo
24	AC	Líquen escleroatrófico	Líquen escleroatrófico
25	MGM	Lúpus	Lúpus
26	LCR	Lúpus	Lúpus
27	IMS	Pênfigo foliáceo	Pênfigo foliáceo
28	AMC	Pênfigo foliáceo	Dermatite psoriasiforme
29	TSC	Lúpus discóide	Lúpus
30	ALG	Dermatite herpetiforme	Bolha intra-epidérmica
31	PS	Pênfigo foliáceo	Dermatite psoriasiforme: fase tardia do pênfigo
32	AVR	Pênfigo vulgar	Pênfigo vulgar
33	NK	Líquen	Líquen escleroatrófico
34	MN	Lúpus	Mucinosose folicular
35	LJP	Vasculite	Vasculite
36	FLG	Dermatose IgA linear	Bolhose subepidérmica
37	VC	Herpes gestacional	Bolhose intra-epidérmica
38	JCS	Pênfigo foliáceo	Pênfigo foliáceo
39	MLCM	Dermatite herpetiforme	Achados inespecíficos
40	AT	Vasculite	Vasculite

Após a correlação clínico-patológica, os pacientes foram diagnosticados como sendo portadores de: lúpus eritematoso em 7 casos (17,5%), sendo que, clinicamente, 3 apresentavam a forma discóide e 4 apresentavam a forma sistêmica; pênfigo em 5 casos (12,5%), sendo 1 do tipo vulgar (2,5%) e 4 do tipo foliáceo (10%); bolhoses subepidérmicas em 5 casos (12,5%); dermatite liquenóide em 5 casos (12,5%), sendo 2 casos de líquen plano (5%), 1 de dermatite liquenóide sem outras especificações (2,5%) e 2 de líquen escleroatrófico (5%); doença bolhosa intra-epidérmica não acantolítica em 4 casos (10%); vasculite em 4 casos (10%); e 1 caso (2,5%) de cada uma das seguintes dermatoses: eritema multiforme, dermatite espongíotica, mucinose folicular, dermatite psoriasiforme, eritema polimorfo à luz e prurigo. Em 4 pacientes (10%) os resultados histopatológicos foram inespecíficos.

5.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Os achados de imunofluorescência direta, dos casos analisados, coletados dos laudos de imunofluorescência, estão listados na tabela 2. Os depósitos ocorreram em 3 diferentes localizações: na zona da membrana basal, vascular ou intercelular.

Dos 40 casos analisados, 30 (75%) apresentaram positividade para um ou mais antígenos estudados. A IgG foi identificada em 12 casos, 7 de localização na zona da membrana basal e 5 de localização intercelular. A IgM foi identificada em 21 casos, todos de localização na zona da membrana basal e um caso também com deposição vascular. A IgA foi encontrada em 5 casos, quatro de localização exclusiva na zona da membrana basal e um com deposição também em vasos. O C3 foi encontrado em 12 casos, sendo que 7 de localização na zona da membrana basal, 4 de distribuição perivascular e 1 de distribuição intercelular.

Em 5 casos a IF foi negativa para todos os antígenos estudados.

Apesar de os padrões de deposição ao nível da zona da membrana basal terem sido subdivididos em linear ou granular, estes não foram avaliados neste trabalho, pois não houve correspondência com os padrões observados na imunoperoxidase.

TABELA 2 - RESULTADOS DA ANÁLISE PELA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Nº	INICIAIS	IgG/IF	IgM/IF	IgA/IF	C3/IF
1	EMP	N	P (MB)	N	N
2	AT	N	N	N	N
3	JPS	N	N	N	N
4	RLS	P (MB)	P (MB)	P (MB)	P (MB)
5	TOJ	N	P (MB)	N	P (V)
6	EC	N	P (MB)	P (MB e V)	N
7	ZSA	N	P (MB)	P (MB)	P (MB)
8	RN	N	P (MB)	N	N
9	CSS	N	N	N	N
10	MCR	P (MB)	P (MB)	N	P (MB)
11	VLF	N	N	N	P (MB)
12	LML	N	N	N	N
13	VLF	N	N	N	P (MB)
14	CMSS	N	P (MB)	N	P (V)
15	DS	N	P (MB)	N	N
16	CM	P (MB)	P (MB)	N	N
17	AKO	N	P (MB)	N	P (V)
18	TPX	P (MB)	P (MB)	N	N
19	SJG	N	P (MB)	N	N
20	NABSL	N	N	N	N
21	AW	N	P (MB)	N	N
22	CPS	N	N	N	N
23	PSS	P (IC)	P (MB)	N	N
24	AC	N	N	N	N
25	MGM	N	N	P (MB)	N
26	LCR	P (MB)	N	N	P (MB)
27	IMS	P (IC)	N	N	P (IC)
28	AMC	P (IC)	P (MB)	N	N
29	TSC	N	P (MB)	N	N
30	ALG	N	P (MB e V)	N	P (V)
31	PSS	N	P (MB)	N	N
32	AVR	P (IC)	N	N	N
33	NK	N	N	N	N
34	MN	P (MB)	N	N	N
35	LJP	N	N	N	N
36	FLG	N	P (MB)	P (MB)	N
37	VC	P (MB)	N	N	P (MB)
38	JCS	P (IC)	N	N	N
39	MLCM	N	P (MB)	N	N
40	AT	N	N	N	N

NOTA: P - positivo
 N - negativo
 MB - membrana basal
 V - vascular
 IC - intercelular

5.3 IMUNOPEROXIDASE

Os achados da imunoperoxidase estão listados na tabela 3.

TABELA 3- RESULTADOS DA ANÁLISE PELA IMUNOPEROXIDASE

Nº	INICIAIS	IgG/IP	IgM/IP	IgA/IP	C3/IP
1	EMP	N	P (V)	P (SE)	P (SE)
2	AT	N	P (V)	N	P (V)
3	JPS	N	N	P (SE)	N
4	RLS	P (MB)	N	P (V)	N
5	TOJ	P (V)	P (V)	P (V)	N
6	EC	N	N	P (MB)	N
7	ZSA	N	N	N	N
8	RN	N	N	N	N
9	CSS	N	N	P (V)	N
10	MCR	N	N	N	N
11	VLF	N	P (V)	P (V)	N
12	LML	N	N	N	N
13	VLF	P (V)	P (V)	P (V)	N
14	CMSS	N	N	N	N
15	DS	N	N	N	N
16	CM	N	N	N	N
17	AKO	N	P (V)	P (V)	N
18	TPX	N	N	N	N
19	SJG	P (IC)	P (IC)	P (IC)	P (IC)
20	NABSL	N	N	N	N
21	AW	N	N	N	N
22	CPS	P (MB)	P (V)	P (MB)	N
23	PSS	P (V)	P (V)	P (V)	P (V)
24	AC	N	N	N	N
25	MGM	N	P (MB)	P (V)	N
26	LCR	N	N	N	N
27	IMS	N	N	P (V)	N
28	AMC	N	N	N	N
29	TSC	N	P (V)	N	N
30	ALG	N	N	N	N
31	PSS	P (V)	P (V)	P (V)	P (V)
32	AVR	P (IC)	P (IC)	P (V)	N
33	NK	N	N	N	N
34	MN	N	P (MB)	N	N
35	LJP	N	N	N	N
36	FLG	N	N	N	N
37	VC	N	N	P (V)	N
38	JCS	P (IC)	N	N	P (IC)
39	MLCM	N	N	N	N
40	AT	N	P (V)	N	N

NOTA: P - positivo
 N - negativo
 MB - membrana basal
 IC - intercelular
 V - vascular
 SE - subepidérmico

Dos 40 casos analisados, 22 (55%) apresentaram positividade para um ou mais antígenos estudados. A IgG foi identificada em 9 casos, sendo 2 de localização na zona da membrana basal, 3 de distribuição intercelular e 4 de localização vascular. A IgM foi identificada em 15 casos, 11 deles de localização vascular, 2 de disposição intercelular e 2 distribuídos na zona da membrana basal. A IgA foi encontrada em 17 casos, sendo 12 de localização vascular, 2 de disposição subepidérmica, 2 de distribuição na zona da membrana basal e 1 de localização intercelular. O C3 foi encontrado em 6 casos, 3 deles de localização perivascular, 2 de distribuição intercelular e 1 de localização subepidérmica.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS DE IMUNOPEROXIDASE E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os resultados da análise pelas técnicas de IFD e IP encontram-se resumidos na tabela 4.

Foram obtidos resultados positivos que permitiram uma conclusão diagnóstica em 29 pacientes (72,5%). A positividade da IP isoladamente foi responsável pelo diagnóstico de apenas 7 pacientes (17,5%) e a positividade da técnica de IF isolada forneceu o diagnóstico em 16 casos (40%). Houve concordância de resultados positivos com os dois métodos em 6 casos (15%), sendo 3 de lúpus, 2 de pênfigo e 1 de IgA linear.

Em um caso o diagnóstico clínico e histológico de eritema multiforme foi substituído pelo de dermatose de IgA linear, comprovado pela deposição de IgA na zona da membrana basal pelas duas técnicas.

Em 5 casos (12,5%) os resultados foram negativos para todas as classes de IG e C por ambos os métodos, o que foi compatível com o diagnóstico clínico, pois tratavam-se de dermatoses que podem ocorrer sem a deposição de IG e C, sendo 3 pacientes com líquen, 1 com rosácea e 1 com vasculite.

Dos 4 casos com achados histológicos inespecíficos, 3 (7,5%) puderam ter os seus diagnósticos clínicos confirmados pela imuno-coloração: 1 com diagnóstico clínico de vasculite, pela deposição vascular de IgA e C3, evidenciada pela IP; 1 com clínica de lúpus e deposição de IgM na membrana basal, demonstrada pela IF e 1 de rosácea, cujos depósitos de IG e C foram negativos por ambas as técnicas.

Em 6 casos (15%) não se obteve diagnóstico definitivo por nenhuma das técnicas. Houve depósitos inespecíficos de IG ou C apenas pela IF em 3 casos, 1 de dermatite liquenóide com deposição de IgM na membrana basal e 2 suspeitas de dermatite herpetiforme com deposição de IgM e C3 em localização vascular em uma e de IgM na zona da membrana basal em ambas. Nos outros 3 casos, tanto a IF como a IP mostraram depósitos inespecíficos: em um caso de prurigo houve deposição vascular de IgG, IgM e IgA pela IP e de C3 na zona da membrana basal pela IF. Em outro caso de prurigo observou-se deposição de IgM e IgA perivascular pela IP e de C3 perivascular e IgM na membrana basal pela IF. Em um caso suspeito de pênfigo foliáceo houve depósitos de todas as IG e C3 em localização perivascular pela IP e de IgM na membrana basal pela IF.

Em dois casos cujo diagnóstico foi confirmado pela IP, os depósitos evidenciados pela IF foram inespecíficos, ocorrendo deposição de IgM na zona da membrana basal no caso n° 1 (diagnóstico de dermatite herpetiforme) e o mesmo tipo de depósito na mesma localização foi encontrado na análise do caso n° 5 (diagnóstico de vasculite).

Cinco pacientes diagnosticados pela IF apresentaram padrão inespecífico de coloração pela IP: o caso n° 11 com deposição vascular de IgM e IgA e diagnóstico de herpes gestacional; o caso n° 19 com depósitos intercelulares de todas as substâncias e diagnóstico de lúpus; o caso n° 23 com deposição vascular de todos os imunorreagentes; o paciente n° 27 com deposição vascular de IgA e diagnóstico de pênfigo e o paciente n° 37 com deposição vascular de IgA com diagnóstico de herpes gestacional.

TABELA 4 - RESULTADOS DA PESQUISA DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELOS MÉTODOS DE IF E IP

Nº	INICIAIS	IgG/IP	IgG/IF	IgM/IP	IgM/IF	IgA/IP	IgA/IF	C3/IP	C3/IF	DIAGNÓSTICO
1	EMP	N	N	P (V)	P (MB)	P (SE)	N	P (SE)	N	D. herpetiforme
2	AT	N	N	P (V)	N	N	N	P (V)	N	Vasculite
3	JPSS	N	N	N	N	P (SE)	N	N	N	Acropustulose
4	RLS	P (MB)	P (MB)	N	P (MB)	P (V)	P (MB)	N	P (MB)	D. herpetiforme
5	TOJ	P (V)	N	P (V)	P (MB)	P (V)	N	N	P (V)	Vasculite
6	EC	N	N	N	P (MB)	P (MB)	P (MB, V)	N	N	IgA linear
7	ZSA	N	N	N	P (MB)	N	P (MB)	N	P (MB)	Líquen plano
8	RN	N	N	N	P (MB)	N	N	N	N	Lúpus
9	CSS	N	N	N	N	P (V)	N	N	N	Vasculite
10	MCR	N	P (MB)	N	P (MB)	N	N	N	P (MB)	Lúpus
11	VLF	N	N	P (V)	N	P (V)	N	N	P (MB)	H. gestationis
12	LML	N	N	N	N	N	N	N	N	Rosácea
13	VLF	P (V)	N	P (V)	N	P (V)	N	N	P (MB)	Inespecífico
14	CMSS	N	N	N	P (MB)	N	N	N	P (V)	Lúpus
15	DS	N	N	N	P (MB)	N	N	N	N	Lúpus
16	CM	N	P (MB)	N	P (MB)	N	N	N	N	Lúpus
17	AKO	N	N	P (V)	P (MB)	P (V)	N	N	P (V)	Inespecífico
18	TPX	N	P (MB)	N	P (MB)	N	N	N	N	Lúpus
19	SJG	P (IC)	N	P (IC)	P (MB)	P (IC)	N	P (IC)	N	Lúpus
20	NBSL	N	N	N	N	N	N	N	N	Líquen plano
21	AW	N	N	N	P (MB)	N	N	N	N	Inespecífico
22	CPS	P (MB)	N	P (V)	N	P (MB)	N	N	N	D. herpetiforme
23	PSS	P (V)	P (IC)	P (V)	P (MB)	P (V)	N	P (V)	N	Pênfigo fol.
24	AC	N	N	N	N	N	N	N	N	Líquen plano
25	MGM	N	N	P (MB)	N	P (V)	P (MB)	N	N	Lúpus
26	LCR	N	P (MB)	N	N	N	N	N	P (MB)	Lúpus
27	IMS	N	P (IC)	N	N	P (V)	N	N	P (IC)	Pênfigo fol.
28	AMC	N	P (IC)	N	P (MB)	N	N	N	N	Pênfigo fol.
29	TSC	N	N	P (V)	P (MB)	N	N	N	N	Lúpus
30	ALG	N	N	N	P (MB, V)	N	N	N	P (V)	Inespecífico
31	PS	P (V)	N	P (V)	P (MB)	P (V)	N	P (V)	N	Inespecífico
32	AVR	P (IC)	P (IC)	P (IC)	N	P (V)	N	N	N	Pênfigo vulgar
33	NK	N	N	N	N	N	N	N	N	Líquen plano
34	MN	N	P (MB)	P (MB)	N	N	N	N	N	Lúpus
35	LJP	N	N	N	N	N	N	N	N	Vasculite
36	FLG	N	N	N	P (MB)	N	P (MB)	N	N	IgA linear
37	VC	N	P (MB)	N	N	P (V)	N	N	P (MB)	H. gestationis
38	JCS	P (IC)	P (IC)	N	N	N	N	P (IC)	N	Pênfigo fol.
39	MLCM	N	N	N	P (MB)	N	N	N	N	Inespecífico
40	AT	N	N	P (V)	N	N	N	N	N	Vasculite

NOTA: IP - imunoperoxidase

N - negativo

IC - intercelular

SE - subepidérmico

IF - imunofluorescência

P - positivo

V - vascular

MB - membrana basal

• depósito específico

• depósito inespecífico

A partir do cruzamento entre os resultados, foram analisadas as frequências em que foram observados resultados positivos e negativos com um ou outro método, para cada uma das substâncias estudadas (tabela 5).

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS DOS DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELA ANÁLISE COM OS MÉTODOS DE IF E IP

	NEGATIVO IF		POSITIVO IF		TOTAL	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
IgG						
Negativo IP	23	57,5	8	20	31	77,5
Positivo IP	5	12,5	4	10	9	22,5
Total	28	70	12	30	40 (n)	100
IgM						
Negativo IP	11	27,5	14	35	25	62,5
Positivo IP	8	20	7	17,5	15	37,5
Total	19	47,5	21	52,5	40 (n)	100
IgA						
Negativo IP	21	52,5	2	5	23	57,5
Positivo IP	14	35	3	7,5	17	42,5
Total	35	87,5	5	12,5	40 (n)	100
C3						
Negativo IP	22	55	12	30	34	85
Positivo IP	6	15	0	0	6	15
Total	28	70	12	30	40 (n)	100

Na análise da deposição de IgG, 23 casos (57,5%) foram negativos e 4 (10%) foram positivos por ambas as técnicas. Cinco casos (12,5%) foram positivos apenas com o método de IP e 8 (20%) o foram apenas com o de IF.

A IgM mostrou-se negativa pelos dois métodos em 11 casos (27,5%) e positiva em 7 casos (17,5%). Depósitos de IgM foram demonstrados apenas pela técnica de IP em 8 casos (20%) e apenas pela IF em 14 casos (35%).

Os depósitos de IgA puderam ser visualizados por ambas as técnicas em 3 casos (7,5%) e foram negativos em 21 casos (52,5%). A IgA foi identificada apenas pelo método de IP em 14 casos (35%) e apenas pela IF em 2 casos (5%).

Vinte e dois (55%) pacientes não demonstraram depósitos de C3 por nenhuma das técnicas e não houve coincidência de resultados positivos. Depósitos de C3 foram visualizados apenas pela técnica de IP em 6 casos (15%) e somente pela IF em 12 (30%).

5.5 ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO DOS DEPÓSITOS

Também foram analisadas as frequências das diferentes localizações dos depósitos, comparando os dois métodos utilizados (tabela 6).

Dois pacientes tiveram depósitos de uma mesma substância em dois locais diferentes: o paciente nº 6, que apresentou deposição de IgA pela IF na membrana basal e nos vasos, e o paciente nº 30, com deposição de IgM na membrana basal e nos vasos também pela análise com IF. Desta forma, os totais parciais de algumas tabelas podem mostrar resultados que, quando somados, não atingem 40 casos (ou 100%). Estes totais estão representados com asterisco (*).

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS DAS LOCALIZAÇÕES DOS DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELA ANÁLISE COM OS MÉTODOS DE IF E IP

	M. BASAL		VASCULAR		INTERCELULAR		SUBEPID.		TOTAL	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
IgG										
M. basal	23	57,5	6	15	2	5	0	0	31	77,5
Vascular	1	2,5	1	2,5	0	0	0	0	2	5
Intercelular	3	7,5	0	0	1	2,5	0	0	4	10
Subepid.	1	2,5	0	0	2	5	0	0	0	0
Total	28	70	7	17,5	5	12,5	0	0	40 (n)	100
IgM										
M. basal	11	27,5	14	35	1	2,5	0	0	25	62,5
Vascular	2	5	0	0	0	0	0	0	2	5
Intercelular	5	12,5	6	15	0	0	0	0	11	27,5
Subepid.	1	2,5	1	2,5	0	0	0	0	2	5
Total	19	47,5	21	52,5	1	2,5	0	0	40 (n)*	100
IgA										
M. basal	21	52,5	2	5	0	0	0	0	23	57,5
Vascular	1	2,5	1	2,5	1	2,5	0	0	2	5
Intercelular	10	25	2	5	0	0	0	0	12	30
Subepid.	2	5	0	0	0	0	0	0	2	5
Total	35	87,5	5	12,5	1	2,5	0	0	40 (n)*	100
C3										
M. basal	22	55	7	17,5	4	10	1	2,5	34	85
Vascular	3	7,5	0	0	0	0	0	0	3	7,5
Intercelular	2	5	0	0	0	0	0	0	2	5
Subepid.	1	2,5	0	0	0	0	0	0	1	2,5
Total	28	70	7	17,5	4	10	1	2,5	40	100

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Com a aplicação do teste não paramétrico para amostras pareadas de McNemar, analisou-se a associação entre os dois métodos (IF e IP). Considerou-se resultado estatisticamente significativo, aquele cujo p-valor foi menor ou igual a 0,05

(nível de significância de 5%). O resultado do teste na análise de deposição de IgG mostrou que não houve diferença significativa entre os dois métodos utilizados ($p = 0,5791$), ou seja, os dois métodos são comparáveis. O mesmo ocorreu para IgM ($p = 0,286$) e C3 ($p = 0,238$). Porém, o resultado obtido para a deposição de IgA mostrou diferença significativa ($p = 0,005$) entre os dois métodos.

Para a comparação entre os resultados de localização dos depósitos obtidos com os dois métodos, calculou-se o coeficiente de Contingência (C). A comprovação da significância desta associação foi obtida com a utilização do teste de Qui-quadrado de Pearson. Também foi utilizado o critério de um p-valor igual ou menor que 0,05 para indicar significância estatística. Não se obteve associação significativa quando comparados os locais de deposição de IgG, IgM, IgA e C3 ($p > 0,05$), embora o p-valor encontrado para a deposição de IgG tenha ficado muito próximo do nível de significância (0,0627). Os resultados da análise estatística encontram-se na tabela 7.

TABELA 7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS ENCONTRADOS QUANTO À POSITIVIDADE DO DEPÓSITO E SUA LOCALIZAÇÃO

	TESTE	RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
IgG	McNemar	$p=0,5791$	=
Localização	Coef. Contingência	$C=0,480$ ($p=0,06257$)	a.n.s.
IgM	McNemar	$p=0,28643$	=
Localização	Coef. Contingência	$C=0,236$ ($p=0,50174$)	a.n.s.
IgA	McNemar	$p=0,00596$	≠
Localização	Coef. Contingência	$C=0,283$ ($p=0,47868$)	a.n.s.
C3	McNemar	$p=0,2386$	=
Localização	Coef. Contingência	$C=0,265$ ($p=0,96328$)	a.n.s.

NOTA: a.n.s: associação não significativa
valores entre parênteses: Qui-quadrado de Pearson
= métodos comparáveis
≠ métodos não comparáveis

6 DISCUSSÃO

A correta identificação dos depósitos de imunoglobulinas e complemento é fundamental na diferenciação diagnóstica das diversas dermatoses auto-imunes e contribui de forma significativa para a sua correta classificação, manejo e controle terapêutico.

O desenvolvimento de técnicas capazes de identificar substâncias depositadas na pele permitiu a compreensão de muitos dos mecanismos de doença até então obscuros, como a formação de bolhas, a destruição da membrana basal ou a alteração da parede vascular. Além disso, estes métodos são cada vez mais utilizados na diferenciação de neoplasias pelo uso de anticorpos específicos para determinados tecidos. A imunofluorescência é a técnica mais amplamente empregada, com sensibilidade e especificidade já bem estabelecidas. Entretanto, esta técnica apresenta alguns inconvenientes, tais como: a necessidade de congelamento imediato do tecido recém-biopsiado; a impossibilidade de realização de estudos retrospectivos; a má preservação da morfologia tecidual nos cortes congelados; a não visualização dos depósitos em nível subcelular; a necessidade de microscópio de epiluminescência, que não está disponível em todos os serviços de patologia; a labilidade da coloração, tornando necessária a documentação fotográfica para análises posteriores; a ligação não específica ocasional e a autofluorescência do tecido, que interferem na interpretação dos resultados (DAVEY et al., 1970; PETTS e ROITT, 1971; THIVOLET et al., 1971; DORLING et al., 1971; LEUNG-TACK et al., 1973; MURPHY et al., 1973; TAYLOR, 1978; MERA et al., 1980; PINKUS, 1982; MASON e GATTER, 1987; DOHERTY et al., 1989).

Mais recentemente, os métodos imuno-histoquímicos, devido às melhorias técnicas e à maior disponibilidade de anticorpos, têm sido utilizados em um maior número de situações. As aplicações destas técnicas para a detecção de imunoglobulinas, a categorização de infiltrados inflamatórios, a identificação de certos

fungos, o estudo das doenças bolhosas subepidérmicas e o diagnóstico das neoplasias foram descritas por vários autores (PENNEYS, 1984; MASON e GATTER, 1987; TRUE, 1988; CEBALLOS, JIMENEZ-ACOSTA e PENNEYS, 1989; ALVES, 1989).

Estes métodos compreendem a utilização da imunoperoxidase, da imunofosfatase alcalina, da imuno-ouro-prata, entre outros marcadores. As vantagens da utilização destas técnicas incluem a permanência da coloração, a obtenção de uma melhor morfologia tecidual, a realização de colorações subseqüentes para a pesquisa de outros Ag em um mesmo fragmento de tecido e a possibilidade da localização ultra-estrutural dos depósitos imunes pela análise com microscopia eletrônica (TAYLOR., 1978; MASON e GATTER, 1987; BHAN, 1995; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, p.97).

Até meados da década de 1970, a técnica de IP só havia sido utilizada em cortes ou amostras congeladas de soro e os resultados morfológicos obtidos com ambas as técnicas (IP e IF) eram semelhantes. A partir do momento em que se observou a possibilidade da aplicação desta técnica em material parafinado, abriu-se um amplo campo para o estudo de uma série de Ac (TAYLOR e BURNS, 1974; BURNS, HAMBRIDGE e TAYLOR, 1974). Entretanto, a aplicação da imuno-histoquímica como método para detecção de IG e C na pele não tem ganho grande aceitabilidade, sendo poucos os trabalhos publicados neste assunto (MERA, YOUNG e BRADFIELD, 1980; TURBITT et al., 1982; HAINES, COOKE e CLARK, 1987; REHMAN et al., 1988; BRADLEY e MAYS, 1990; ZAENGLEIN, HAFER e HELM, 1995).

6.1 DA AMOSTRA

Devido ao pequeno número de procedimentos de imunofluorescência neste meio, refletindo não só o reduzido número de casos, mas também as dificuldades pertinentes ao método, esta casuística englobou dermatoses variadas e em número reduzido. Adicionalmente, muitos casos foram excluídos da análise pois, após a correlação clínico-patológica, foi verificado que se tratavam de dermatoses não auto-imunes. Naquelas com suspeita de dermatose auto-imune, ou não foi possível obter todos os resultados da imunofluorescência, ou os blocos de parafina não estavam disponíveis, ou os fragmentos residuais nos blocos de parafina não permitiram recortes

para a realização da imuno-histoquímica. Desta forma, dos 186 casos inicialmente selecionados, foi possível a correlação completa em apenas 40, os quais são motivo deste estudo.

A finalidade desta análise foi a de testar a aplicabilidade da imuno-histoquímica, sem considerar nesta casuística doenças específicas. Para tanto, foram utilizadas tabelas de contingência que exprimem o resultado do cruzamento simples dos dados obtidos com as duas técnicas e, a partir das frequências observadas, foram aplicados testes estatísticos não paramétricos. Estes testes permitiram a comparação entre os dois métodos quanto à presença de depósitos imunes e quanto à sua localização quando positivos.

As principais dermatoses incluídas nesta casuística foram as doenças bolhosas auto-imunes, o lúpus eritematoso e as vasculites, o mesmo grupo de doenças investigadas por TURBITT et al. (1982), em um conjunto de 22 biópsias. REHMAN et al. (1988) também analisaram 40 casos de pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de pênfigo, penfigóide e dermatite herpetiforme. Em cães, HAINES, COOKE e CLARK (1987) avaliaram a aplicabilidade da imuno-histoquímica em cortes parafinados, comparando os achados com os da imunofluorescência, em 47 biópsias de pele com suspeita de pênfigo e penfigóide canino. Também BRADLEY e MAYS (1990) avaliaram os resultados obtidos com este método em cortes parafinados em 22 cães com pênfigo vulgar, lúpus ou pênfigo foliáceo.

6.2 DA FIXAÇÃO E DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Neste estudo, os fragmentos de pele obtidos foram processados rotineiramente no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas e mantidos em arquivo na forma de blocos de parafina. Não foi possível definir se o tempo de fixação deste material foi uniforme ou se houve variação na concentração da formalina, parâmetros estes que podem ter influenciado nos resultados da avaliação imuno-histoquímica. Além disso, nesse laboratório, não é rotina o uso da solução de

formalina tamponada, a qual impediria a acidificação do fixador e o comprometimento da reação antígeno-anticorpo.

CURRAN e GREGORY (1980) testaram uma série de fixadores e observaram que as várias etapas de processamento em parafina dos tecidos amostrados tiveram pouca ou nenhuma influência na identificação de IG depositadas. Referiram ainda que as soluções hipotônicas mostraram-se superiores às isotônicas para a visualização dos antígenos e que, no formaldeído a 4%, apenas um pequeno número de células plasmáticas contendo IG pôde ser detectado. Entretanto, referiram que a espessura dos cortes teve influência considerável na resposta ao método PAP de coloração. FARR e NAKANE (1981) observaram que todos os fixadores à base de formaldeído comercialmente disponíveis continham metanol e estabilizadores que poderiam ter efeitos deletérios nas reações imuno-histoquímicas. Desta forma, indicaram a utilização de fixadores preparados pelo próprio pesquisador, como o formaldeído-ácido pícrico, o periodato-lisina-paraformaldeído e o formaldeído tamponado para evitar a perda da imunorreatividade.

Sobre o tempo de fixação, ELIAS et al. (1989) referiram que, se a fixação em formalina fosse muito curta (3-6h), os tecidos seriam apenas parcialmente fixados, o que resultaria em cortes bem fixados na periferia, porém com a porção central mal fixada pela coagulação alcoólica, podendo fornecer resultados falso-negativos, fato este melhor evidenciado em material de grande volume. Já os tecidos fixados por tempo prolongado, isto é, maior do que 24 horas, poderiam se tornar não-reativos por inativação dos sítios antigênicos. Destacaram ainda que a utilização de formalina tamponada era superior à formalina comum para a preservação dos Ag. Posteriormente, BHAN (1995) referiu que, mesmo incluído em parafina, o armazenamento prolongado do material poderia levar à perda de antigenicidade.

Entretanto, com o desenvolvimento das técnicas de recuperação antigênica, muitos dos inconvenientes decorrentes do fixador ou fixação inadequados podem atualmente ser contornados (MERA, YOUNG e BRADFIELD, 1980; FARR e NAKANE, 1981; PINKUS, 1982; FALINI e TAYLOR, 1983).

6.3 DA COLORAÇÃO DE FUNDO E RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

Utilizou-se neste estudo o procedimento da imunoperoxidase com a revelação da reação antígeno-anticorpo efetuada pela diaminobenzidina. Com a utilização deste cromógeno, os locais onde esta reação ocorre, adquirem uma coloração marrom bem definida (GRAHAM e KARNOVSKI, 1966).

Vários autores observaram que um dos inconvenientes desta técnica em cortes parafinados era a presença da coloração de fundo inespecífica, o que dificultaria a análise dos depósitos, sugerindo o desenvolvimento de métodos capazes de contornar este problema (PINKUS, 1982; FALINI e TAYLOR, 1983; SHEIBANI e TUBBS, 1984; MASON e GATTER, 1987). Dentre os métodos que diminuiriam as reações inespecíficas estariam o desenvolvimento de anticorpos com maior especificidade e de maior sensibilidade, possibilitando diluições maiores, além de métodos que aumentassem a acessibilidade aos sítios antigênicos (FALINI e TAYLOR, 1983; SHEIBANI e TUBBS, 1984).

Nesta análise foi considerada reação inespecífica ou negativa quando a mesma mostrou-se mais fraca ou de intensidade semelhante à coloração de fundo. Entretanto, em alguns casos a diferença de intensidade da cor marrom foi difícil de ser definida, principalmente naqueles em que a coloração de fundo foi um pouco mais acentuada. Além disso, notaram-se também reações inespecíficas em algumas células inflamatórias, provavelmente devido à presença de peroxidase endógena não completamente bloqueada.

Apesar desses inconvenientes, de uma forma geral conseguiu-se uma reação adequada bloqueando-se a peroxidase endógena com a utilização de peróxido de hidrogênio diluído a 3% em metanol por 30 minutos, além do bloqueio dos sítios inespecíficos com soro não-imune.

Segundo SHEIBANI e TUBBS (1984), a peroxidase estaria presente naturalmente nos tecidos e a coloração de fundo resultante poderia ser minimizada pelo uso de enzimas proteolíticas, pela pré-incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio e metanol e pela utilização de controles não expostos ao Ac primário.

Atualmente, o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio e metanol já faz parte das recomendações dos fabricantes de lotes de Ac e é um passo incluído rotineiramente na maioria dos protocolos de coloração imunoenzimática (BHAN, 1995).

Além do bloqueio da peroxidase endógena, avaliou-se a possibilidade de utilização da digestão enzimática para a exposição de uma maior quantidade de sítios antigênicos.

Alguns autores obtiveram bons resultados com a utilização da digestão com enzimas e preconizaram a sua utilização para a recuperação de sítios antigênicos não detectáveis, provavelmente pela destruição de ligações cruzadas existentes entre as proteínas, causadas pela fixação em formaldeído (MERA, YOUNG e BRADFIELD, 1980; HAUTZER, WITTKUHN e MCCAUGHEY, 1980; PINKUS, 1982).

Preliminarmente, foram utilizadas tripsina e pronase em câmara úmida a 37°C por períodos que variaram de 5 a 40 minutos. Os melhores resultados, isto é, menor coloração de fundo e maior diluição dos anticorpos, foram obtidos aplicando-se tripsina diluída a 0,1% por 30 minutos à temperatura de 37°C. Tempos maiores resultaram em descolamento mais freqüente dos fragmentos das lâminas e diminuição da coloração por digestão excessiva. Já a tripsinização por menor tempo resultou em permanência da coloração de fundo. A digestão com pronase não se mostrou superior à tripsina para a diminuição da coloração de fundo.

Em contrapartida, TURBITT et al. (1982) mostraram que o pré-tratamento com tripsina resultou em descolamento dos fragmentos das lâminas e não aumentou o número de resultados positivos. Da mesma forma, SHEIBANI e TUBBS (1984) citaram que a recuperação antigênica com tratamento enzimático teria o inconveniente de resultados às vezes imprevisíveis, sendo que o próprio Ag em investigação poderia ser digerido pela enzima. Em 1993, CATTORETTI et al. concluíram que a digestão enzimática teria um limitado grau de efetividade em cortes parafinados.

ZAENGLEIN, HAFER e HELM (1995) relataram que a tripsinização não conseguiu restaurar a antigenicidade do tecido cutâneo, no estudo de casos de

dermatite herpetiforme e, ao contrário, resultou em total falta de coloração. Já com o uso da pronase durante 15 minutos, obtiveram melhores resultados.

No presente estudo observou-se que, apesar de ter havido recuperação parcial da imunorreatividade após a digestão enzimática, a coloração de fundo permaneceu um problema, principalmente na região perivascular. Em alguns casos foram observados depósitos perivasculares para todas as classes de IG e C3 e estes foram considerados inespecíficos.

A fim de diminuir o inconveniente do descolamento dos fragmentos pelo tratamento enzimático, utilizou-se o pré-tratamento das lâminas com Poly-L-Lysine Hydromide (Sigma Chemical Company, P1274, St. Louis, MO, USA), com a obtenção de bons resultados. Já BRADLEY e MAYS (1990) utilizaram adesivo de Elmer com o mesmo efeito.

Também foi testada a utilização do forno de microondas na tentativa de se obter uma melhor reação imunológica. Após a desparafinização, realizou-se o aquecimento dos cortes em solução tampão de citrato de sódio (10 mMol, pH 6,0) por 10 minutos, de maneira intermitente. Após o resfriamento da solução, os cortes foram então processados de maneira habitual, não sendo observada melhora significativa nos resultados da imunocoloração.

CUEVAS et al. (1994) demonstraram que o aquecimento por microondas possibilitou a detecção de 20 dos 80 anticorpos testados em material processado em parafina, com imunocoloração prévia negativa e, em 21 anticorpos, houve melhora na coloração obtida quando comparados os resultados aos conseguidos antes do pré-aquecimento. Também SHI, KEY e KALRA (1991) comprovaram que o aquecimento pelas microondas foi superior ao aquecimento convencional e à digestão enzimática na recuperação antigênica. Entretanto, estes autores não utilizaram anti-imunoglobulinas e o efeito do aquecimento com forno de microondas para aumentar a antigenicidade das mesmas permanece desconhecido, ou, conforme foi observado neste estudo, não traria maiores benefícios.

6.4 DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Dentre as várias técnicas disponíveis, utilizou-se nesta metodologia a técnica do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC). Este método utiliza a avidina, uma glicoproteína que possui 4 sítios de ligação com grande afinidade pela biotina. A reação é realizada em três fases principais: a inicial, com a aplicação de um anticorpo primário não marcado, seguida da aplicação de um anticorpo secundário marcado com biotina e, finalmente, a utilização do complexo avidina-biotina peroxidase, com posterior revelação da reação com diaminobenzidina ou outro cromógeno (HSU, RAINE e FANGER, 1981). Este método foi o escolhido devido à sua alta sensibilidade e especificidade, sendo que essa sensibilidade pode ser de 20 a 40 vezes maior do que a obtida com o método PAP (HSU, RAINE e FANGER, 1981). Por outro lado, FALINI e TAYLOR (1983) salientaram que o método ABC tem sensibilidade comparável ao método PAP. A especificidade do método ABC está aumentada pela grande afinidade da avidina pela biotina e a sensibilidade está relacionada com a maior quantidade de moles de peroxidase que poderia se agregar ao sítio do anticorpo primário (DOHERTY et al., 1989; PENNEYS, 1984).

A utilização de Ac e reagentes de boa qualidade também é um passo importante para a determinação de bons resultados. Num estudo comparativo entre 11 sistemas avidina-biotina comercialmente disponíveis, HAPPERFIELD et al. (1993) observaram maior sensibilidade com a utilização das marcas Dako, StABC e VectorElite. Neste estudo, foram utilizados reagentes e Ac da marca Dako.

6.5 DOS RESULTADOS DA IMUNOPEROXIDASE

Em 32,5% dos casos a positividade pelo método de IP confirmou o diagnóstico clínico e histopatológico. Em 5 casos (12,5%) os resultados da análise pela IP foram negativos para todas as classes de IG e C, confirmando o diagnóstico clínico,

pois tratavam-se de dermatoses que podem ocorrer sem a deposição de IG e C. Portanto, obteve-se confirmação diagnóstica pela técnica de IP em 45% dos casos.

Em um caso o diagnóstico clínico e histológico de eritema multiforme foi substituído pelo de dermatose de IgA linear, comprovado pela deposição de IgA na zona da membrana basal por ambas as técnicas.

Apenas em um caso, cuja avaliação histopatológica havia sido inconclusiva, a IP confirmou o diagnóstico clínico de vasculite, pela deposição perivascular de IgA. Em 3 casos analisados (7,5%) houve deposição inespecífica de IG ou C na região perivascular. Estes depósitos eram discretos e de duas ou mais substâncias, e foram desconsiderados.

A análise estatística evidenciou que os resultados encontrados com a utilização dos dois métodos foram comparáveis quanto à deposição de IgG, IgM e C3. Porém, houve diferença significativa na comparação entre os dois métodos quando pesquisada a deposição de IgA ($p=0,00596$).

A maioria dos estudos em dermatopatologia que compararam a especificidade e sensibilidade do método de marcação com a IP, com as obtidas com a técnica de IF, utilizou tecidos frescos congelados (FUKUYAMA et al., 1970; THIVOLET et al., 1971; MURPHY, DEODHAR e CAWLEY, 1973; BOORSMA, NIEBOER e KALSBECK, 1975; ZANIN et al., 1978; TROST, STEIGLEDER e BODEUX, 1980; KONTOCHRISTOPOULOS et al., 1995; TEBBE et al., 1995). Nesses estudos, os resultados foram variáveis, mas com predomínio de sensibilidade e especificidade semelhantes com ambas as técnicas.

Somente a partir de 1974, iniciou-se a aplicação da técnica da IP em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina e esta passou a ser uma das principais vantagens deste método de coloração (TAYLOR e BURNS, 1974; BURNS, HAMBRIDGE e TAYLOR, 1974). Já nestes relatos, esses autores referiram que os resultados de estudos-piloto na pesquisa de IG extracelulares pelos métodos de IP e IF em cortes parafinados não foram tão bons quanto os encontrados com a utilização de material congelado. TAYLOR, CHIR e PHILL (1978) referiram que a maior vantagem

da técnica de IP era a sua compatibilidade com os métodos rotineiros de fixação em formaldeído, inclusão em parafina e com uma variedade de contracolorações. A utilização desta técnica em material parafinado para o estudo das dermatoses auto-imunes iniciou-se na década de 1980.

TURBITT et al. (1982) realizaram a técnica de IP para a avaliação de depósitos de IG e C em cortes de pele parafinados e congelados de pacientes com doenças bolhosas, lúpus e vasculite. A positividade geral da técnica de IP foi de 72% (16 de 22 casos). Nos cortes congelados houve um alto grau de correlação entre os resultados, entretanto, no material parafinado notou-se um baixo índice de positividade com a IP. Demonstraram ainda que a tripsinização não aumentou o número de casos positivos e, em alguns casos, forneceu resultados falso-positivos.

FALINI e TAYLOR (1983) salientaram a dificuldade de identificação das IG de superfície pela IP em cortes parafinados e referiram que, na pesquisa deste tipo de substância, as amostras congeladas seriam melhores.

HAINES, COOKE e CLARK (1987) mostraram que das 28 biópsias de pele de cães com dermatoses auto-imunes diagnosticadas pela avaliação histológica, 27 também o foram pela IP (método ABC). Em 12 casos, a avaliação histológica foi inconclusiva e em 7 destes a IHQ não permitiu um diagnóstico definitivo. Concluíram que isto ocorreu principalmente devido à inflamação crônica ou aguda, associada ou não à infecção bacteriana, que resultou em coloração homogênea semelhante à coloração de fundo.

REHMAN et al. (1988) avaliaram 40 biópsias de pele de pacientes com dermatoses bolhosas auto-imunes fixadas em formalina e incluídas em parafina pela técnica da IP (método PAP). Dos 29 casos de pênfigo, obtiveram positividade em 79,3% (IgG); dos 10 casos de penfigóide, apenas 50% foram positivos; um caso de dermatite herpetiforme foi analisado e mostrou-se negativo; e os 10 casos de dermatoses não bolhosas foram negativos. Concluíram que a discrepância observada entre os achados da análise histológica habitual e os obtidos pela técnica da IP poderia ser devida, parcialmente, à seleção pobre do local da biópsia ou coleta inadequada das amostras.

Notaram ainda que a coloração de fundo estava presente em quase todos os casos, mesmo com a utilização da digestão enzimática e bloqueio da peroxidase endógena.

BRADLEY e MAYS (1990) analisaram 22 cães com doenças de pele auto-imunes pelo método da IP (ponte enzimática) em cortes parafinados. Observaram 8 casos de lúpus e 14 de pêfigo. A percentagem de resultados positivos foi de 47% pela IF e de 59% pela IP, e os autores referiram que os resultados falso-negativos ainda permaneceram um problema. Explicaram as discrepâncias entre as técnicas pela possível redução da antigenicidade no material fixado em formalina e pelo fato de que as biópsias foram realizadas em locais diferentes, o que poderia levar a resultados diferentes, já que as IG podem estar presentes de maneira transitória nas doenças de pele auto-imunes (WERNER, BROWN e HALLIWELL, 1983).

Esses dados estão de acordo com este estudo, demonstrando que a análise dos depósitos de IG e C em cortes de pele fixados em formalina e incluídos em parafina pelo método de IP fornecem uma positividade bastante variável (50 a 96,4%).

É possível que áreas de inflamação aguda ou crônica resultem em coloração inespecífica, já que as células inflamatórias possuem peroxidase endógena que pode ser evidenciada durante o procedimento IHQ, mesmo com a utilização de métodos de bloqueio da mesma. Além disso, nem a digestão enzimática, nem o tratamento com microondas conseguiram inibir definitivamente a coloração de fundo, e este permanece um problema a ser superado.

SHEIBANI e TUBBS (1984) referiram que a presença de pseudo-peroxidases, como a hemoglobina, poderia resultar em significativa coloração de fundo.

Nos casos de dermatite herpetiforme, sabe-se que o local ideal para a realização da biópsia é a pele sã perilesional e não o local da bolha. Como para a análise histológica de rotina prefere-se o sítio da bolha, a impossibilidade de demonstrar a deposição de IgA nestes fragmentos pode ter ocorrido pela inadequação do local da biópsia.

O caso com diagnóstico clínico de acropustulose mostrou deposição de IgA subepidérmica apenas pela técnica de IP. Isto concorda com a conclusão de alguns

autores que demonstraram a deposição de imunoglobulinas na pele de crianças com acropustulose (JORDAN et al., 1988).

6.6 DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Observou-se positividade em 22 casos (55%) pela técnica de IF. Destes, houve concordância de resultados positivos com os dois métodos em apenas 6 casos (15%), sendo 3 de lúpus, 2 de pênfigo e 1 de IgA linear.

Os 5 casos negativos pela IP também o foram pela IF.

Apenas em um caso, cuja avaliação histopatológica havia sido inconclusiva, a IF confirmou o diagnóstico clínico de lúpus, pela deposição de IgM na zona da membrana basal.

Os depósitos inespecíficos evidenciados pela IF ocorreram na membrana basal isoladamente em 4 casos e em associação com deposição vascular em 2 e foram de IgM associada ou não a C3.

MERA, YOUNG e BRADFIELD (1980) usaram a técnica de IF em material fixado em formalina e incluído em parafina para avaliar o depósito de IG, complemento e fibrinogênio em doenças de pele auto-ímmunes (pênfigo, penfigóide e lúpus) e compararam os resultados obtidos com o material congelado dos mesmos pacientes. A avaliação dos depósitos de C3 foi a mais difícil, com resultados negativos em todos os cortes de parafina, embora positivos nos de criostato. Defenderam a utilização da IF ao invés das técnicas de IP para a pesquisa de IG e C, pois os métodos de IP não eram amplamente utilizados e eram de difícil estabelecimento como um método diagnóstico regular e reprodutível.

6.7 PROBLEMAS INERENTES À TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE

Apesar de os tecidos parafinados fornecerem excelente detalhe morfológico, ficou demonstrado que a fixação pode alterar a imunorreatividade de alguns antígenos como, por exemplo, as IG depositadas na pele e a avaliação das desordens renais e

linfo-proliferativas (SHEIBANI e TUBBS, 1984; ELIAS et al., 1989). Antígenos de superfície celular em pequenas quantidades, como as IG de superfície, não são bem visualizadas nos cortes, mesmo quando utilizados cortes de criostato (TAYLOR, CHIR E PHIL, 1978).

CORWIN e GOWN (1989) analisaram 9 Ac comumente utilizados para a avaliação de tumores em tecidos processados rotineiramente e concluíram que nenhum oferecia sensibilidade e especificidade absolutas, restando ao patologista o papel de assegurar que a fixação e o processamento do tecido fossem adequados e o de realizar um amplo painel de Ac de forma a determinar com confiança o diagnóstico.

A visualização de Ag pelos procedimentos de IP depende do desenvolvimento de contraste entre a coloração do antígeno e o fundo. Coloração de fundo específica pode resultar da presença de Ag em concentrações variadas no material analisado. A difusão para fora da célula de Ag intracelulares no momento da fixação também pode contribuir para este tipo de coloração. Além disso, qualquer grau de infiltrado inflamatório, de necrose tecidual ou de autólise, pode produzir difusão do Ag (TAYLOR, CHIR E PHIL, 1978).

O anticorpo, quando policlonal, pode conter outras especificidades além daquelas relacionadas a um Ag em particular, e este problema pode ser evitado com o uso de Ac monoclonais (FALINI e TAYLOR, 1983; SHEIBANI e TUBBS, 1984; MASON e GATTER, 1987).

Coloração de fundo inespecífica pode ocorrer, se houver absorção tecidual não específica de proteínas séricas ou difusão extracelular de Ag (cortes mal congelados ou mal preparados). Este problema pode ser contornado pela inativação de proteínas estranhas ou pela titulação de todos os passos do procedimento de forma a alcançar as diluições que só detectem os Ac específicos (BEUTNER et al., 1975; HALE et al., 1975).

A peroxidase endógena pode ocorrer naturalmente em tecidos, incluindo células vermelhas, leucócitos e peroxissomos do fígado, dificultando a análise dos depósitos. Além disso, as pseudo-peroxidases, tais como a hemoglobina, podem

também resultar em significativa coloração de fundo. A inativação da peroxidase endógena pela incubação com peróxido de hidrogênio e metanol e o uso de controles não expostos ao Ac primário permitem uma análise melhor dos cortes (TAYLOR, CHIR E PHIL, 1978; HEYDERMAN, 1979; FALINI e TAYLOR, 1983).

A recuperação de sítios antigênicos anteriormente não identificados pela digestão enzimática pode trazer resultados benéficos, mas os resultados nem sempre são previsíveis, principalmente na tentativa de se localizar IG de superfície ou extracelulares, pois o próprio Ag é suscetível à ação das enzimas proteolíticas (SHEIBANI e TUBBS, 1984).

7 CONCLUSÕES

- Foi possível a análise dos depósitos imunes nos cortes de pele fixados em formalina e incluídos em parafina pela técnica da imunoperoxidase.
- Os métodos de imunofluorescência e imunoperoxidase foram comparáveis quanto à deposição de IgG, IgM e C3, mas não na identificação de depósitos de IgA. Entretanto, quando analisados os locais dos depósitos, não houve associação significativa entre os dois métodos para nenhuma das substâncias estudadas.

Além disso, quando só se dispõe de material fixado em formalina e incluído em parafina, o método de imunoperoxidase pode auxiliar na avaliação dos depósitos de imunoglobulinas e complemento na pele, trazendo resultados comparáveis aos obtidos com a técnica de imunofluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K. The Immune System. In: COLVIN, R.B; BHAN, A.K.; MCCLUSKEY, R.T. **Diagnostic Immunopathology**. New York : Raven Press, 1995. p.1-22.
- ALVES, V.A.F. Contribuição da imunohistoquímica ao diagnóstico de neoplasias. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v.35, n.3, p.83, 1989.
- AVRAMEAS, S. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immuno-histochemistry. **Histochem. J.**, v.4, n.4, p.321-330, 1972.
- AVRAMEAS, S.; URIEL, J. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. **C.R. Acad. Sc. Paris**, v.262, n.24, p.2543-5, 1966.
- BAART DE LA FAILLE-KUYPER E.H.; BAART DE LA FAILLE, H. An immunofluorescence study of lichen planus. **Br. J. Dermatol.**, v.90, n.4, p.365-71, 1974.
- BAART DE LA FAILLE-KUYPER, E.H.; VAN DER MEER, J.B.; KATER, L.; MUL, N. Alternate-pathway complement activation by IgA in Schoenlein-Henoch's syndrome. **Neth. J. Med.**, v.17, n.1, p.5-11, 1974.
- BAART DE LA FAILLE-KUYPER, E.H.; KATER, L.; KOOIKER, C.J.; DORHOUT MEES, E.J. IgA deposits in cutaneous blood-vessels walls and mesangium in Henoch-Schöenlein syndrome. **Lancet**, v.21, p.892-3, 1973.
- BARNARD, G.J.R.; COLLINS, W.P. The development of luminescence immunoassays. **Med. Lab. Sci**, v.44, n.3, p.249-266, 1987.
- BEAN, S.F. Cicatricial pemphigoid. **Arch. Dermatol.**, v.110, p.552-5, 1974.
- BEAN, S.F.; Blister fluid in pemphigus. **J. Invest. Dermatol.**, v.53, n.3, p.187, 1969.
- BELLON, B.; SAPIN, C., DRUET, P. Comparaison de la sensibilité des techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase en méthodes directe et indirecte. **Ann. Immunol.**, v.126 C, n.1, p.15-22, 1975.
- BENSON, M.D.; COHEN, A.S. Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. **Ann. Int. Med.**, v.73, n.6, p.943-9, 1970.
- BEUTNER, E.H.; JORDON, R.E. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.117, p.505-10, 1964.
- BEUTNER, E.H.; JORDON, R.E.; CHORZELSKI, T.P. The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid. **J. Invest. Dermatol.**, v.51, n.2, p.63-80, 1968.

- BEUTNER, E.H.; LEVER, W.F.; WITEBSKY, E.; JORDON, R.; CHERTOCK, B. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. **JAMA**, v.192, n.8, p.682-8, 1965.
- BEUTNER, E. H.; DENG, J.S.; SHU, S.; ANDERSEN, P. Studies on defined immunofluorescence in clinical immunopathology III. Past progress, some new methods and prospects for the future. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.254, n. , p.573-91, 1975.
- BHAN, A.K. Immunoperoxidase. In: COLVIN, R.B; BHAN, A.K.; MCCLUSKEY, R.T. **Diagnostic Immunopathology**. New York : Raven Press, 1995. p.711-23.
- BHOGAL, B.; WOJNAROWSKA, F.; MARSDEN, R.A.; DAS, A.; BLACK, M.M.; MCKEE, P.H. Linear IgA bullous dermatosis of adults and children: na immunoelectron microscopic study. **Br. J. Dermatol.**, v.117, p.289-96, 1987.
- BOORSMA, D.M.; NIEBOER, C.; BRUYNZEEL, D.P. Immunoenzyme histochemistry and dermatoses. **Neth. Soc. Proc.**, v. , n., p.115-116.
- BOORSMA, D.M.; NIEBOER, C.; KALSBECK, G.L. The direct immunoperoxidase and immunoglobulin-enzyme bridge methods compared with the immunofluorescence method in dermatology. **J. Cut. Pathol.**, v.2, p.294-301, 1975.
- BOORSMA, D.M.; STREFKERK, J.G.; KORS, N. Peroxidase and fluorescein isothiocyanate as antibody markers: a quantitative comparison of the two peroxidase conjugates prepared with glutaraldehyde or periodate and fluorescein conjugate. **J. Histochem. Cytochem.**, v.24, n.9, p.1017-25; 1976.
- BRADLEY, G.A; MAYS, C. Immunoperoxidase staining for the detection of autoantibodies in canine autoimmune skin disease; comparison to immunofluorescence results. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.26, n.2, p.105-113, 1990.
- BURNHAM, T.K.; FINE, G. The immunofluorescent "band" test for lupus erythematosus. **Arch. Dermatol.**, v.103, n.1, p.24-32, 1971.
- BURNHAM, T.K.; FINE, G.; NEBLETT, T.R. Immunofluorescent "band" test for lupus erythematosus. **Arch. Dermatol.**, v.102, n.1, p.42-50; 1970.
- BURNHAM, T.K.; NEBLETT, T.R.; FINE, G. The application of the fluorescent antibody technic to the investigation of lupus erythematosus and various dermatoses. **J. Invest. Dermatol.**, v.41, n.1, p.451-6, 1963.
- BURNS, J.; HAMBRIDGE, M.; TAYLOR, C.R. Intracellular immunoglobulins: a comparative study on three standard tissue processing methods using horseradish peroxidase and fluorochrome conjugates. **J. Clin. Pathol.**, v.27, n.7, p.548-57, 1974.
- BYSTRYN, J.C.; ABEL, E.; DEFEO, C. Pemphigus foliaceus: subcorneal intercellular antibodies of unique specificity. **Arch. Dermatol.**, v.110, p.857-61, 1974.
- CAMPOS, H. **Estatística Experimental Não-Paramétrica**. São Paulo : ESALQ, 1983.

- CATTORETTI, G.; PILERI, S.; PARRAVICINI, C.; BECKER, M.H.G.; POGGI, S.; BIFULCO, C.; et col. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. **J. Pathol.**, v.171, p.83-98, 1993.
- CEBALLOS, P.; JIMENEZ-ACOSTA, F.; PENNEYS, N.S. Immunohistochemical techniques in non-neoplastic conditions. **Sem. Dermatol.**, v.8, n.4, p.276-82, 1989.
- CELESTE, B.J.; GUIMARÃES, M.C.S.; CORRALES, E.M. Peroxidase antibody test for mucocutaneous leishmaniasis serology, performances indexes and comparison with a fluorescent antibody test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.30, n.6, p.411-4, 1988.
- CHIU, K.Y.; CHAN, K.W. Rapid immunofluorescence staining of human renal biopsy specimens using microwave irradiation. **J. Clin. Pathol.**, v.40, n.6, p.689-92, 1987.
- CHORZELSKI, T.P.; BEUTNER, E.H. Factors contributing to occasional failures in demonstration of pemphigus antibodies by the immunofluorescence test. **J. Invest. Dermatol.**, v.53, n.3, p.188-191, 1969.
- CHORZELSKI, T.P.; JABLONSKA, S. IgA linear dermatosis of childhood (chronic bullous disease of childhood). **Br. J. Dermatol.**, v.101, p.535-42, 1979.
- CHORZELSKI, T.P.; WEISS, J.F.V.; LEVER, W.F. Clinical significance of autoantibodies in pemphigus. **Arch. Dermatol.**, v.93, n.5, p.570-6, 1966.
- COLLIER, P.M.; KELLY, S.E.; WOJNAROWSKA, F. Linear IgA disease and pregnancy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.30, n.3, p.407-11, 1994.
- COLLINS, A.B. Immunofluorescence. In: COLVIN, R.B.; BHAN, A.K.; MCCLUSKEY, R.T. **Diagnostic Immunopathology**. New York : Raven Press, 1995. p.699-710.
- COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.47, p.200-202, 1941.
- COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N., BERLINER, E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. **J. Immunol.**, v.45, p.159-170, 1942.
- CORWIN, D.J.; GOWN, A.M. Review of selected lineage-directed antibodies useful in routinely processed tissues. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.113, n.6, p.645-52, 1989.
- COVENTRY, B.J.; NEOH, S.H.; MANTZIORIS, B.X.; SKINNER, J.M.; ZOLA, H., BRADLEY, J. A comparison of the sensitivity of immunoperoxidase staining methods with high-sensitivity fluorescence flow cytometry-antibody quantitation on the cell surface. **J. Histochem. Cytochem.**, v.42, n.8, p.1143-7, 1994.
- CRICKX, B. Les techniques d'immunofluorescence cutanée. **Presse Med.**, v.14, n.41, p.2097-2101, 1985.

- CUEVAS, E.C.; BATEMAN, AC.; WILKINS, B.S.; JOHNSON, P.A.; WILLIAMS, J.H.; LEE, AH.S.; JONES, D.B.; WRIGHT, D.H. Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J. Clin. Pathol.*, v.47, n.5, p.448-52, 1994.
- CURRAN, R.C.; GREGORY, J. Effects of fixation and processing on immunohistochemical demonstration of immunoglobulin in paraffin sections of tonsil and bone marrow. *J. Clin. Pathol.*, v.33, n.11, p.1047-57, 1980.
- DAVEY, F.R.; BUSCH, G.J. Immunohistochemistry of glomerulonephritis using horseradish peroxidase and fluorescein-labeled antibody: a comparison of two technics. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.53, n.4, p.531-6, 1970.
- DOHERTY, M.J.; RUSSO, G.G.; JOLLY, H.W.; STEWART, K.R. Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.20, n.5:1, p.827-37, 1989.
- DORLING, J.; JOHNSON, G.D.; WEBB, J.A.; SMITH, M.E. Use of peroxidase-conjugated antiglobulin as an alternative to immunofluorescence for the detection of antinuclear factor in serum. *J. Clin. Pathol.*, v.24, p.501-5, 1971.
- EGELRUD, T.; BÄCK, O. Dermatitis herpetiformis: "pH optimum" for the release of potentially antigen-binding IgA fragments from papillary dermis of uninvolved skin by peptic digestion. *Arch. Dermatol. Res.*, v.278, n.1, p.44-8, 1985.
- ELIAS, J.M.; GOWN, A.M.; NAKAMURA, R.M.; WILBUR, D.C.; HERMAN, G.E.; JAFFE, E.S.; BATTIFORA, H.; BRIGATI, D.J. Quality control in immunohistochemistry: report of a workshop. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.92, n.6, p.836-43, 1989.
- EMANCIPATOR, S.N.; LAMM, M.E. Antibody-mediated reactions. In: COLVIN, R.B.; BHAN, A.K.; MCCLUSKEY, R.T. **Diagnostic Immunopathology**. New York : Raven Press, 1995. p.41-60.
- ENG, A.M.; MONCADA, B. Bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis. *Arch. Dermatol.*, v.110, p.51-7, 1974.
- FALINI, B.; DE SOLAS, I.; HALVERSON, C.; PARKER, J.W.; TAYLOR, C.R. Double labeled-antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, v.30, n.1, p.21-26, 1982.
- FALINI, B.; TAYLOR, C.R. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.107, p.105-17, 1983.
- FARR, A.G.; NAKANE, P.K. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. *J. Immunol. Methods*, v.47, n.2, p.129-44, 1981.
- FINE, J.D. Immunobullous Diseases. In: SAMS JR, W.M.; LYNCH, P. J. **Principles and Practice of Dermatology**. 1.ed. London : Churchill Livingstone, p.419-37, 1990.
- FLOTTE, T.J.; MARGOLIS, R.N.; MIHM JR., M.C. Skin. In: COLVIN, R.B.; BHAN, A.K.; MCCLUSKEY, R.T. **Diagnostic Immunopathology**. New York : Raven Press, 1995. p.123-38.

- FRASER, N.G. Autoantibodies in dermatitis herpetiformis. **Br. J. Dermatol.**, v.83, n.6, p.609-13, 1970.
- FROST A.R.; ORENSTEIN, J.M.; ABRAHAM, A.A; SILVERBERG, S.G. A comparison of the usefulness of electron microscopy and immunohistochemistry. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.118, p.922-6, 1994.
- FRY, L.; SEAH, P.P. Dermatitis herpetiformis: an evaluation of diagnostic criteria. **Br. J. Dermatol.**, v.90, p.137-46, 1974.
- FUKUYAMA, K.; DOUGLAS, S.D.; TUFFANELLI, D.L.; EPSTEIN, W.L. Immunohistochemical method for localization of antibodies in cutaneous disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.54, p.410-8, 1970.
- GAMMON, R.W.; FINE, J.D.; FORBES, M.; BRIGGAMAN, R.A. Immunofluorescence on split skin for the detection and differentiation of basement membrane zone autoantibodies. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.27, n.1, p.79-87, 1992.
- GEORGE, P.M.; HOOD, A.F.; REST, E.B. Histopathology and immunofluorescence of discoid lupus erythematosus in children. **Pediat. Dermatol.**, v.13, n.4, p.269-73, 1996.
- GRAHAM, R.C.; KARNOVSKI, M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. **J. Histochem. Cytochem.**, v.14, n.4, p.291-302, 1966.
- GUEDES, Antonio Carlos Martins. **Estudo da pele e de mucosas no pênfigo foliáceo endêmico por imunofluorescência direta, imunohistoquímica e microscopia eletrônica.** São Paulo, 1996. Tese (Doutorado em Dermatologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- HAFTEK, M.; ZONE, J.J.; TAYLOR, T.B.; KOWALEWSKI, C.; CHORZELSKI, T.P.; SCHMITT, D. Immunogold localization of the 97-kD antigen of linear IgA bullous dermatosis detected with patients' sera. **J. Invest. Dermatol.**, v.103, n.5, p.656-9, 1994.
- HAINES, D.M.; COOKE, E.M.; CLARK, E.G. Avidin-biotin-peroxidase complex immunohistochemistry to detect immunoglobulin in formalin fixed skin biopsies in canine autoimmune skin disease. **Can. J. Vet. Res.**, v.51, n.1, p.104-9, 1987.
- HALE, W.L.; NISENGARD, R.J.; SHU, S. Studies on defined immunofluorescence in clinical immunopathology: I. Comparisons of chessboard titrations with IgG polymer particles and with indirect immunofluorescence systems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.254, p. 551-8, 1975.
- HANKER, J.S; YATES, P.E.; METZ, C.B.; RUSTIONI, A. A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. **Histochem. J.**, v.9, p.789-92, 1977.
- HAPPERFIELD, L.C.; BOBROW, L.G.; BAINS, R.; MILLER, K.D. Peroxidase labelling immunocytochemistry: a comparison of eleven commercially-available avidin-biotin systems. **Br. J. Biomed. Sci.**, v.50, p.21-6, 1993.

- HASHIMOTO, K.; SHAFRAN, K.M.; WEBBER, P.S.; LAZARUS, G.S.; SINGER, K.H. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. **J. Exp. Med.**, v.157, n.1, p.259-72, 1983.
- HAUTZER, N.W.; WITTKUHN, J.F.; MCCAUGHEY, W.T.E. Trypsin digestion in immunoperoxidase staining. **J. Histochem. Cytochem.**, v.28, n.1, p.52-3, 1980.
- HEYDERMAN, E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. **J. Clin. Pathol.**, v.32, p.971-8, 1979.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **J. Histochem. Cytochem.**, v.29, p.577-84, 1981.
- JONES, J.C.R.; YOKOO, K.M.; GOLDMAN, R.D. Further analysis of pemphigus autoantibodies and their use in studies on the heterogeneity, structure, and function of desmosomes. **J. Cell Biol.**, v.102, n.3, p.1109-17, 1986.
- JORDA, E.; MORAGON, M.; VERDEGUER, J.M.; RAMON, D.; BETLLOCH, I. A propos d'un cas d'acropustulose infantile avec immunofluorescence directe positive. **Ann. Dermatol. Venereol.**, v.115, p.39-41, 1988.
- JORDON, R.E. Cutaneous immunopathology: investigative and clinical applications. In: ROOK, A.; SAVIN, J. **Recent Advances in Dermatology**, n.5, Churchill Livingstone, 1980, p.1-33.
- JORDON, R.E.; BEUTNER, E.H.; WITEBSKY, E.; BLUMENTAL G.; HALE, W.L.; LEVER, W.F. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. **JAMA**, v.200, n.9, p.751-8, 1967.
- JORDON, R.E.; TRIFTSHAUSER, C.T.; SCHROETER, A.L. Direct immunofluorescent studies of pemphigus and bullous pemphigoid. **Arch. Dermatol.**, v.103, p.486-91, 1971.
- KALSBECK e CORMANE (1964)
- KANITAKIS, J.; MAUDUIT, G.; COZZANI, et al. Linear IgA bullous dermatosis of childhood with autoantibodies to a 230 kDa epidermal antigen. **Pediat. Dermatol.**, v.11, n.2, p.139-44, 1994.
- KANO, K.; BEUTNER, F.H.; MILGROM, F. Humoral antibodies in sera of patients with bullous skin diseases. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.127, n.2, p.355-9, 1968.
- KATZ, S.I.; HERTZ, K.C.; YAOITA, H. Herpes Gestationis: immunopathology and characterization of the HG factor. **J. Clin. Invest.**, v.57, n.6, p.1434-41, 1976.
- KAWANA, S.; GEOGHEGAN, W.D.; JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. II. Complement enhanced detachment of epidermal cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v.61, n.3, p.517-25, 1985.
- KONTOCHRISTOPOULOS, G.J.; ARONI, K.; PANTELEOS, D.N.; TOSCA, A.D. Immunohistochemistry in histoid leprosy. **Int. J. Dermatol.**, v.34, n.11, p.777-85, 1995.

- KUTZNER, H.; KUTZNER, U. Detection of immunoglobulin deposits in paraffin with the peroxidase-antiperoxidase method. **Hautarzt**, v.37, n.9, p.503-6, 1986.
- LANDRY, M.; SAMS JR., W.M. Systemic lupus erythematosus: studies of the antibodies bound to skin. **J. Clin. Invest.**, v.52, n.3, p.1871-80, 1973.
- LEONARD, L.N.; HAFFENDEN, G.P.; RING, N.P.; MCMINN, R.M.H.; SIDGWICK, ^a; MOWBRAY, J.F.; UNSWORTH, D.J.; HOLBOROW, E.J.; BLENKINSOPP, W.K.; SWAIN, ^aF.; FRY, Lionel. Linear IgA disease in adults. **Br. J. Dermatol.**, v.107, p.301-16, 1982.
- LEONG, A.S.Y.; MILIOS, J. Accelerated immunohistochemical staining by microwaves. **J. Pathol.**, v.161, p.327-34, 1990.
- LEONG, A.S.Y.; MILIOS, J.; DUNCIS, C.G. Antigen preservation in microwave-irradiated tissues: a comparison with formaldehyde fixation. **J. Pathol.**, v.156, p.275-82, 1988.
- LEUNG-TACK, J.; MONIER, J.C.; THIVOLET, J. Antinuclear antibodies: comparison of the morphological aspects and sensitivity of immunoperoxidase and immunofluorescence techniques. **Arch. Dermatol. Res.**, v.247, n.2, p.161-170, 1973.
- MASON, D.Y.; GATTER, K.C. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. **J. Clin. Pathol.**, v.40, p.1042-54, 1987.
- MATTHEWS, J.B. Influence of clearing agent on immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissue. **J. Assoc. Clin. Pathol.**, v.34, n.1, p.103-5, 1981.
- MERA, S.L.; YOUNG, E.W.; BRADFIELD, J.W.B. Direct immunofluorescence of skin using formalin-fixed paraffin-embedded sections. **J. Clin. Pathol.**, v.33, n.4, p.365-9, 1980.
- MEYER, L.J.; CARIOTO, L.; ZONE, J.J. Dermatitis herpetiformis: extraction of intact IgA from granular deposits in dermal papillae. **J. Invest. Dermatol.**, v.88, n.5, p.559-63, 1987.
- MURPHY, W.M.; DEODHAR, S.D.; CAWLEY, L.P. Use of horseradish peroxidase in identification of serum antibodies and immune complexes. **Clin. Chem.**, v.19, n.2, p.1370-73, 1973.
- NAGANO, T.; TANI, M.; ADACHI, A.; TAKANAGA, T.; SAKAMOTO, S.; KODAMA, S.; FUJIWARA, S. Childhood bullous pemphigoid: immunohistochemical, immunoelectron microscopic, and Western blot analysis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.30, n.5, p.884-8, 1994.
- NAKANE, P.K.; PIERCE JR.; G.B. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. **J. Cell Biol.**, v.33, n.2, p.307-18, 1967.
- NAKANE, P.K.; PIERCE JR.; G.B. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. **J. Histochem. Cytochem.**, v.14, n.2, p.929-31, 1966.

- NICOLAS, J.F.; MACHADO, P.; COZZANI, E.; SCHMITT, D. Techniques d'immunofluorescence appliquées au diagnostic des dermatoses bulleuses auto-immunes de la jonction dermo-épidermique. *Ann. Dermatol. Venerol.*, v.120, p.715-22, 1993.
- NIIMI, Y.; ZHU, X.J.; BYSTRYN, J.C. Identification of cicatricial pemphigoid antigens. *Arch. Dermatol.*, v.128, p.54-7, 1992.
- NORTON, A J. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J. Pathol.*, v.171, p.79-80, 1993.
- PARISH, W.E. Cutaneous vasculitis: antigen-antibody complexes and prolonged fibrinolysis. *Proc. R. Soc. Med.*, v.65, n.3, p.276-8, 1972.
- PARISH, W.E. e RHODES, E.L. Bacterial antigens and aggregated gamma globulin in the lesions of nodular vasculitis. *Br. J. Dermatol.*, v.79, p.131-47, 1967.
- PECK, S.M.; OSSERMAN, K.E.; WEINER, L.B.; LEFKOVITS, A.; OSSERMAN, R.S. Studies in bullous diseases: immunofluorescent serologic tests. *N. England J. Med.*, v.279, n.8, p.951-8, 1968.
- PENNEYS, N.S. Immunoperoxidase methods and advances in skin biology. *J. Am. Acad. Dermatol.*; v.11, n.2:1, p.284-90, 1984.
- PETTS, V.; ROITT, I.M. Peroxidase conjugates for demonstration of tissue antibodies: evaluation of the technique. *Clin. Exp. Immunol.*, v.9, n.3, p.407-18, 1971.
- PINKUS, G.S. Diagnostic immunocytochemistry of paraffin-embedded tissues. *Hum. Pathol.*, v.131, n.5, p.411-15, 1982.
- PROPHT, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington : American Registry of Pathology, 1984.
- PROST, C. L'immunopathologie des dermatoses bulleuses autoimmunes. *Ann. Pathol.*, v.12, n.4-5, p.276-83, 1992.
- RASKIN, J. Antigen-antibody reaction site in contact dermatitis. *Arch. Dermatol.*, v.83, n.1, p.459-65, 1961.
- REHMAN, H.; AHMAD, M.; KHAN, A.A.; SIRAJ, Q.H.; AHMED, S.A. A study of immunoperoxidase technique in the immunohistopathological diagnosis of autoimmune bullous diseases. *JPMA*, p.154-8, 1988.
- SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI E.A. **Dermatologia**. São Paulo : Artes Médicas, 1998. p.1-1155.
- SANCHES JR, J.A. **Imunofluorescência direta nos pênfigos vegetans e foliáceo endêmico (FS): estudo comparativo e revisão da literatura**. São Paulo, 1994. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) – Universidade Federal de São Paulo.
- SATO, Y.; MUKAI, K.; WATANABE, S.; GOTO, M.; SHIMOSATO, Y. The AMeX method, a simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am. J. Pathol.*, v.125, n.3, p.431-5, 1986.

- SCHILTZ, J.R.; MICHEL, B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. **J. Invest. Dermatol.**, v.67, n.2, p.254-60, 1976.
- SEAH, P.P.; FRY, L. Immunoglobulins in the skin in dermatitis herpetiformis and their relevance in diagnosis. **Br. J. Dermatol.**, v.92, n.2, p.157-166, 1975.
- SHARMA, H.M.; KAUFFMAN, E.M.; McGAUGHY, V.R. Improved immunoperoxidase staining using microwave slide drying. **Lab. Med.**, v.21, n.10, p.658-660, 1990.
- SHEIBANI, K.; TUBBS, R.R. Enzyme immunohistochemistry: technical aspects. **Sem. Diagn. Pathol.**, v.1, n.4, p.235-49, 1984.
- SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J. Histochem. Cytochem.**, v.39, n.6, p.741-8, 1991.
- SHIN, R.W.; IWAKI, T.; KITAMOTO, T.; TATEISHI, J. Hydrated autoclave pretreatment enhances TAU immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. **Lab. Invest.**, v.64, n.5, p.693-702, 1991.
- SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N.J. **Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento**. McGraw-Hill. 1956.
- SINGER, S.J.; SCHICK, A. The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.9, p.519-537, 1961.
- SMITH, J.B.; TAYLOR, T.B.; ZONE, J.J. The site of blister formation in dermatitis herpetiformis is within the lamina lucida. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.27, n.2:1, p.209-213, 1992.
- STRINGA, S.G.; BIANCHI, C.; ZINGALE, S.B. Nodular vasculitis: immunofluorescent study. **J. Invest. Dermatol.**, v.46, n.1, p.1-5, 1966.
- TAO, Q.; SRIVASTAVA, G.; LOKE, S.L.; CHAN, E.Y.T.; HO, F.C.S. Improved double immunohistochemical staining method for cryostat and paraffin wax sections, combining alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase and indirect immunofluorescence. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.597-600, 1994.
- TAYLOR, C.R. Immunoperoxidase techniques. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.102, p.113-21, 1978.
- TAYLOR, C.R. Quality assurance and standardization in immunohistochemistry. A proposal for the annual meeting of the biological stain commission, 1991. **Biotec. Histochem.**, v.67, n.2, p.110-7, 1992.
- TAYLOR, C.R.; BURNS, Jr. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase labelled antibody. **J. Clin. Pathol.**, v.27, p.14-20, 1974.

- TEBBE, B.; MAZUR, L.; STADLER, R.; ORFANOS, C.E.
Immunohistochemical analysis of chronic discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus-relation to immunopathological mechanisms. **Br. J. Dermatol.**, v.132, p.25-31, 1995.
- THIVOLET, J.; BEYVIN, A.J. Anticorps anti-épiderme dans les dermatoses bulleuses. **Bull. Soc. Fr. Dermatol. Syphilig.**, v.74, n.3, p.300-4, 1967.
- THIVOLET, J.; LEUNG TACK, J.; PAGE, Y.; SCHMITT, D. Utilisation d'anticorps marqués a la peroxydase pour la recherche et le diagnostic immunologiques. **Presse Med.**, v.25, n.55, p.2542-4, 1971.
- TROST, T.H.; STEIGLEDER, G.K.; BODEUX, E. Immuno-electron microscopical investigations with a new tracer: peroxidase-labeled protein-A: application for detection of pemphigus and bullous pemphigoid antibodies. **J. Invest. Dermatol.**, v.75, n.4, p.328-30, 1980.
- TRUE, L.D. Quantitative immunohistochemistry: a new tool for surgical pathology? **Am. J. Clin. Pathol.**, v.90, n.3, p.324-5, 1988.
- TSE, Y.; LIM, H.W. Chronic bullous dermatosis of childhood: differentiation from another autoimmune blistering diseases in children. **Int. J. Dermatol.**, v.33, n.7, p.507-9, 1994.
- TUFFANELLI, D.L. Cutaneous immunopathology: recent observations. **J. Invest. Dermatol.**, v.65, n.1, p.143-53, 1975.
- TURBITT, M.L.; MACKIE, R.M.; YOUNG, H.; CAMPBELL, I. The use of paraffin-processed tissue and the immunoperoxidase technique in the diagnosis of bullous diseases, lupus erythematosus and vasculitis. **Br. J. Dermatol.**, v.106, p.411-18, 1982.
- VAN DER MEER, J.B. Granular deposits of immunoglobulins in the skin of patients with dermatitis herpetiformis. An immunofluorescent study. **Br. J. Dermatol.**, v.81, n.7, p.493-503, 1969.
- WAISMAN, M.; DUNDON, B.C.; MICHEL, B. Immunofluorescent studies in lichen nitidus. **Arch. Dermatol.**, v.107, n.2, p.200-3, 1973.
- WAKELIN, S.H.; ALLEN, J.; WOJNAROWSKA, F. Childhood bullous pemphigoid - report of a case with dermal fluorescence on salt-split skin. **Br. J. Dermatol.**, v.133, p.615-8, 1995.
- WALDORF, D.S.; SMITH, C.W.; STRAUSS, A.J.L. Immunofluorescent studies in pemphigus vulgaris. **Arch. Dermatol.**, v.93, n.1, p.28-33, 1966.
- WALLACE, M.L.; SMOLLER, B.R. Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.34, n.2, p.163-83, 1996.
- WERNER, L.L.; BROWN, K.A.; HALLIWELL, R.E.W. Diagnosis of autoimmune skin disease in the dog: correlation between histopathologic, direct immunofluorescent and clinical findings. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.5, p.47-64, 1983.
- WOJNAROWSKA, F.; BHOGAL, B.S.; BLACK, M.M. Chronic bullous disease of childhood and linear IgA disease of adults are IgA1-mediated diseases. **Br. J. Dermatol.**, v.131, p.201-4, 1994.

- WOODLEY, D.T.; BRIGGAMAN, R.A. New immunologic techniques for the fine diagnosis of blistering diseases. **Sem. Dermatol.**, v.7, n.3, p.178-85, 1988.
- YANCEY, K.B. The diagnosis and biology of bullous diseases, **Arch. Dermatol.**, v.130, p.983-7, 1994.
- YARDY, T.; LIM, H.W. Chronic bullous dermatosis of childhood: differentiation from other autoimmune blistering diseases in children. **Int. J. Dermatol.**, v.33, n.7, p.507-9, 1994.
- ZAENGLIN, A.L.; HAFER, L.; HELM, K.F. Diagnosis of dermatitis herpetiformis by an avidin-biotin-peroxidase method. **Arch. Dermatol.**, v.131, p.571-3, 1995.
- ZANIN, L.G.; SCHMITT, D.; OHRT, C.; THIVOLET, J. Immunofluorescence et immunoperoxidase: comparaison de la sensibilité en immunopathologie cutanée. **Ann. Dermatol. Venereol.**, v.105, p.793-8, 1978.
- ZIVONY, D.; COHEN B.A. Chronic bullous disease of childhood. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v.148, p.533-4, 1994.

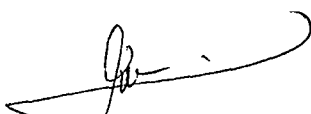
Curitiba, 14 de agosto de 1996.

Ilma Sra.
Dra. Kerstin Taniguchi
Departamento de Pediatria
Neste

Prezada Senhora:

Informo que o projeto "**Avaliação e Depósitos Imunes nas Doenças Imunobolhosas e Vasculites Leucocitoclásticas pela Técnica da Imunoperoxidação**" foi aprovado na reunião da Comissão de Ética Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná no dia 30/07/96.

Atenciosamente


Prof. Renato Tambara Filho
Presidente da Comissão de
Ética Médica da UFPR


Dr. Niazzy Ramos Filho
Secretário da Comissão de
Ética Médica da UFPR



HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Departamento de Pediatria
Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria

Rua: General Carneiro, 181 - 14º andar - 80 060-900 - Curitiba - PR.
Fone/Fax: (041) 360-1600 - Ramal: 6494 - E-mail: pgradped@hc.ufpr.br

Declaração

Declaramos para os devidos fins, que a *Dra. Kerstin Taniguchi Abago*, apresentou a Dissertação: *"AVALIAÇÃO DE DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM CORTES DE PELE FIXADOS EM FORMALINA E INCLUÍDOS EM PARAFINA"*, ao Curso de Pós-Graduação - MESTRADO EM PEDIATRIA da Universidade Federal do Paraná, no dia 1º de fevereiro de 1999, com a seguinte Banca Examinadora: *Prof. Dra. Leide Parolin Marinoni/UFPR, PRESIDENTE DA BANCA e ORIENTADORA DO TRABALHO; Prof. Dr. José Fillus Neto/UFPR, Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho/UFPR e o Prof. Dr. Antonio Carlos Martins Guedes/UFMG*, tendo sido aprovada, podendo receber o título de:

"Mestre em Pediatria"

Curitiba, 1º de fevereiro de 1999

Prof. Dr. Ronald Cavalcante de Figueiredo
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
Mestrado em Pediatria



Parecer

Parecer conjunto dos Professores: *Dr. Sérgio Ossamu Doshii, Dr. José Filles Neto, Dr. Luiz de Lacerda Filho* e o *Dr. Antonio Carlos Martins Guedes*, sobre a dissertação: "AVALIAÇÃO DE DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO PELA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM CORTES DE PELE FIXADOS EM FORMALINA E INCLUÍDOS EM PARAFINA", a nível de Mestrado em Pediatria, da aluna: *Dra. Karstin Taniguchi Aboga*, do Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão Examinadora considerou que a *Dra. Karstin Taniguchi Aboga*, apresentou trabalho adequado para a dissertação a nível de Mestrado em Pediatria e defendeu convenientemente as argüições que lhes foram feitas, atribuindo-lhes as seguintes notas:

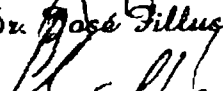
<i>Prof. Dr. Sérgio Ossamu Doshii</i>	<i>Nota (100)</i>	<i>e Conceito "A"</i>
<i>Prof. Dr. José Filles Neto</i>	<i>Nota (100)</i>	<i>e Conceito "A"</i>
<i>Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho</i>	<i>Nota (100)</i>	<i>e Conceito "A"</i>
<i>Prof. Dr. Antonio Carlos Martins Guedes</i>	<i>Nota (100)</i>	<i>e Conceito "A"</i>
Tendo a candidata sido aprovada com	<i>Média Final (100)</i>	<i>e Conceito "A"</i> .

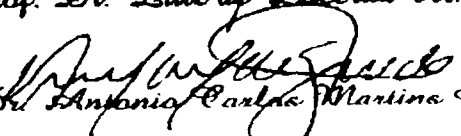
sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná, a concessão de título de "Mestre em Pediatria" e a publicação da dissertação em veículo de divulgação conveniente.

Curitiba, 1º de fevereiro de 1999


Prof. Dr. Sérgio Ossamu Doshii


Prof. Dr. José Filles Neto


Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho


Prof. Dr. Antonio Carlos Martins Guedes