

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA
CAMILA DE ANDRADE LIMA ARCOVERDE

**DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-DESMOGLEÍNA 1 E 3 NA SALIVA E
SORO DE PACIENTES PORTADORES DE PÊNFIGO**

Recife - PE

2010

CAMILA DE ANDRADE LIMA ARCOVERDE

**DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-DESMOGLEÍNA 1 E 3 NA SALIVA E
SORO DE PACIENTES PORTADORES DE PÊNFIGO**

Dissertação apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra de Albuquerque T. Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Recife - PE

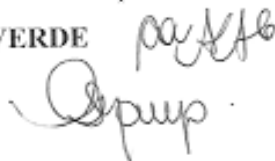
2010

Ata da 90ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 09 de fevereiro de 2010.

Às 09:00(nove horas) do dia 09 (nove) do mês de fevereiro do ano de dois mil e dez, reuniram-se no auditório do Curso de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. LUCIA CARNEIRO DE SOUZA BEATRICE , atuando como presidente, Prof.Dr. PAULO ROBERTO ELEUTERIO DE SOUZA da UFRPE atuando como primeiro examinador. Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“COMPARAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ANTI-CORPOS ANTI-DESMOGLEÍNA 1 E 3 NA SALIVA E SORO DE PACIENTES PORTADORES DE PÊNFIGO**, da mestranda CAMILA DE ANDRADE LIMA ARCOVERDE, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação da Professora Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO e Co-orientação do Prof.Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO. Profa. Dra. LUCIA CARNEIRO DE SOUZA BEATRICE, Vice-Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Odontologia abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a CD. CAMILA DE ANDRADE LIMA ARCOVERDE., para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os Examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. PAULO ROBERTO ELEUTERIO DE SOUZA **(APROVADA)**, Prof .Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS,**(APROVADA)** Profa. Dra. LUCIA CARNEIRO DE SOUZA BEATRICE, **(APROVADA)**, a candidata recebeu três conceitos **(APROVADA)** é considerada (**APROVADA**), devendo a candidata acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso, face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia, cabendo a



Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, A Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Ozicleire Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE, CAMILA DE ANDRADE LIMA ARCOVERDE



Recife, 09 de fevereiro de 2010.


Profa.Dra. LUCIA CARNEIRO DE SOUZA BEATRICE

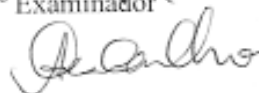
Presidente


Prof. Dr. PAULO ROBERTO FLEUTERIO DE SOUZA

1º Examinador


Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS

2º Examinador



DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Ana e Homero, pelo amor, educação, apoio e orientações tão importantes para meu crescimento;

Aos meus irmãos Marina e Pedro, pela silente, porém sincera torcida;

Ao meu namorado Felipe, pelo incentivo, ajuda e carinho, nos momentos mais importantes;

Às minhas grandes e eternas amigas Luana Moraes, Beatriz Cavalcanti, Clarissa Falcão, Suzana Lubambo, Andrea Raíza, Larissa Martins e LÍlian Paiva, que foram, em diferentes momentos, fundamentais para meu amadurecimento;

Ao meu grande amigo Paulo Roberto, por sua amizade de todos os tempos.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e equilíbrio para alcançar meus objetivos;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho, pela confiança;

Aos Profs. Drs. Jair Carneiro Leão e Luiz Alcino Gueiros pelo apoio e orientações;

À colega e amiga, Samantha Cardoso de Andrade, pela imensurável ajuda, incentivo e amizade em cada etapa deste trabalho;

Ao colega Jefferson de Almeida, por estar sempre tão disposto a compartilhar seus conhecimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

A todos os professores, colegas e funcionários da Graduação e Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, por me darem condições de chegar até aqui;

Aos pacientes que tornaram possível a realização deste trabalho, passando, muitas vezes, por cima de dificuldades financeiras na esperança de ter melhores condições de vida;

Por fim, a todos aquele que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Trabalhe como se tudo dependesse de ti,
e confie como se tudo dependesse de Deus.”*

Santo Inácio de Loyola

RESUMO

O pênfigo é um grupo de doenças muco-cutâneas, de origem auto-imune, relacionado à produção de anticorpos contra importantes componentes da adesão celular, as desmogleínas. Estas patologias são caracterizadas pela formação de bolhas intra-epiteliais que podem acometer a pele e membranas mucosas. O pênfigo vulgar e o pênfigo foliáceo são os subtipos mais comuns deste grupo, e, apesar de raros, têm sua importância devido à alta taxa de mortalidade quando não tratados. O teste ELISA tem sido bastante utilizado para diagnóstico sorológico destas doenças, mas pouco se sabe sobre sua eficácia quando da utilização da saliva como material biológico. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de auto-anticorpos IgG anti-desmogleína 1 e 3 na saliva de pacientes com pênfigo e comparar com sua presença no soro. Também foram investigadas associações entre a presença sérica dos auto-anticorpos e a atividade das lesões e a influência do tratamento sistêmico. O grupo estudado foi composto por 24 pacientes, dos quais 19 eram portadores de pênfigo vulgar e 5 de pênfigo foliáceo. Destes pacientes foram colhidas amostras de sangue e saliva que foram processadas e realizado o teste ELISA. Como resultado obteve-se que 8,3% das amostras de saliva reagiram positivamente para as desmogleínas estudadas, o que se mostrou estatisticamente significativo ($p < 0,05$). No entanto, não foi percebida relação entre a presença sérica destas e a existência de lesões ativas, a terapia medicamentosa também pareceu não ter influência sobre presença dos auto-anticorpos no soro ($p > 0,05$). Pode-se concluir que as desmogleínas 1 e 3 estão presentes na saliva dos pacientes com pênfigo.

Palavras-chave: pênfigo, ELISA, saliva, desmogleína 1, desmogleína 3.

ABSTRACT

ABSTRACT

Pemphigus is a group of autoimmune mucocutaneous diseases, related to the production of antibodies against important components of cellular adhesion, the desmogleins. These pathologies are characterized by intra-epithelial blistering affecting the skin and mucous membranes. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus are the most common subtypes and, although rare, are important due to their high mortality rate when not treated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been largely used to serological diagnostic of these diseases, but not much is known about its efficacy in detecting the desmogleins antibodies in saliva. The aim of this study was to evaluate the presence of autoantibodies IgG antidesmoglein 1 and 3 in saliva from pemphigus patients and to compare with the presence of the same antibodies in serum. It was also assessed relation between the antibody presence in serum and the disease severity and the influence of systemic therapy with corticosteroids. The studied group was composed by 24 patients of which 19 were pemphigus vulgaris patients and 5 were pemphigus foliaceus patients. From all patients were collected blood and saliva samples that were processed and ELISA tested. The results showed a statistically significant ($p < 0.05$) presence of antidesmoglein 1 and 3 in saliva from the studied group, 8.3% reacted positively to the desmogleins. It was not possible to correlate the presence of desmoglein in serum and the disease severity or the systemic treatment ($p > 0.05$). Those findings suggest that desmogleins 1 and 3 can be found in saliva from pemphigus patients..

Keywords: pemphigus, ELISA, saliva, desmoglein 1, desmoglein 3.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos pacientes segundo o tipo de doença, uso de medicação e ocorrência de lesão ativa	35
Tabela 2	Avaliação dos auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 no soro e na saliva no PV e PF	36
Tabela 3	Distribuição da presença da anti-Dsg1 no soro e na saliva	37
Tabela 4	Distribuição da presença da anti-Dsg3 no soro e na saliva	38
Tabela 5	Distribuição auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 no soro e na saliva de acordo com o uso de medicação	39
Tabela 6	Distribuição dos auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 no soro e na saliva de acordo com a ocorrência de lesão ativa	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
CN	Controle negativo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CP	Controle positivo
Dsg	Desmogleína
Dsg1	Desmogleína 1
Dsg3	Desmogleína 3
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i>
IL-10	Interleucina 10
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MBL	<i>Medical and Biological Laboratories</i>
PF	Pênfigo foliáceo
PV	Pênfigo vulgar
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

Artigo	21
Resumo	23
Introdução	24
Métodos	25
Resultados	27
Discussão	29
Agradecimentos	32
Referências	32
Tabelas	35
Apêndices	41
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	42
Apêndice B - Ficha clínica	45
Anexos	46
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	47
Anexo B - Normas da revista <i>The Journal of Dermatology</i>	48

ARTIGO

DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS ANTI-DESMOGLEÍNA 1 E 3 NA SALIVA E SORO DE PACIENTES PORTADORES DE PÊNFIGO

Camila de Anadrade Lima Arcoverde¹; Jair Carneiro Leão²; Alessandra de Albuquerque
Tavares Carvalho³

1. Aluna do mestrado em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Pós-Doutor em Medicina Oral, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Doutora em Estomatologia, Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Endereço onde o trabalho foi realizado:

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901

Endereço para correspondência:

Alessandra de A. T. Carvalho

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife - PE, Brasil, CEP 50670-901

Telefone: + 55 81 2126 8817, Fax: + 55 81 2126 8836

E-mail: camila.arcoverde@gmail.com

Título resumido:

Anti-Dsg 1 e 3 em pacientes com pênfigo

Resumo

O pênfigo é um grupo de doenças muco-cutâneas, de origem auto-imune, relacionado à produção de anticorpos contra importantes componentes da adesão celular, as desmogleínas. Estas patologias são caracterizadas pela formação de bolhas intra-epiteliais, seguidas de ulceração, podendo acometer pele e membranas mucosas. O teste ELISA tem sido bastante utilizado para diagnóstico sorológico destas doenças, mas pouco se sabe sobre sua eficácia na detecção destes anticorpos na saliva. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de auto-anticorpos IgG anti-desmogleína 1 e 3 na saliva de pacientes com pênfigo e comparar com sua presença no soro. Também foram investigadas associações entre a presença sérica dos auto-anticorpos e a atividade das lesões e a influência do tratamento sistêmico. Para isto foram estudados 24 pacientes, 19 portadores de pênfigo vulgar e 5 de pênfigo foliáceo. Destes, foram colhidas amostras de sangue e de saliva que foram processadas para a realização do teste ELISA. Os resultados obtidos mostraram uma presença significativa de anti-desmogleína 1 e 3 na saliva dos pacientes estudados ($p < 0,05$), porém não foi percebida relação entre a presença sérica destas e a existência de lesões ativa. A terapia medicamentosa também não pareceu ter influência sobre presença dos auto-anticorpos no soro. Assim, pode-se concluir que os anticorpos anti-desmogleínas 1 e 3 estão presentes tanto na saliva quanto no soro dos pacientes com pênfigo.

Palavras-chave: pênfigo, ELISA, saliva, desmogleína 1, desmogleína 3.

Introdução

O pênfigo faz parte de um grupo de doenças crônicas, auto-imunes, vesículo-bolhosas, composto pelo vulgar (PV), foliáceo (PF), vegetante, paraneoplásico, eritematoso e induzido por drogas, que são caracterizados histologicamente pela perda da adesão celular (acantólise) causada pela produção de auto-anticorpos contra desmogleínas (Dsg) e clinicamente pela formação de bolhas, seguidas de úlceras, em membranas mucosas e ou em pele^{1, 2, 3, 4}.

As Dsg pertencem a um grupo de caderinas desmossômicas que agem como moléculas de adesão intercelular conectando ceratinócitos^{5, 6}. A reação dos auto-anticorpos produzidos no pênfigo com as Dsg presentes na superfície celular dos ceratinócitos levam a separação destas células gerando, assim, bolhas intra-epiteliais⁴.

Os subtipos mais comuns do pênfigo são o PV e o PF, com incidência estimada de 0,1 a 0,5 por 100.000 pessoas por ano, o PV⁷, e cerca de 0,5 por 100.000 pessoas por ano, o PF⁸. Em regiões endêmicas a prevalência do PF pode chegar a 3,4%⁹. Cada um desses subtipos apresenta diferentes características clínicas e imunopatológicas⁴. O PV causa lesões que podem acometer tanto a pele quanto membranas mucosas, enquanto que no PF o paciente apresenta lesões exclusivamente em pele¹⁰. Isto acontece porque no PV o paciente pode produzir exclusivamente IgG anti-Dsg3 ou também IgG anti-Dsg1; enquanto que pacientes com PF produzem apenas IgG anti-Dsg1⁴.

A Dsg3 está localizada, principalmente, na porção mais profunda da epiderme, enquanto que a Dsg1 está situada na região mais superficial, este perfil de distribuição explica o fato do PV afetar membranas mucosas, onde há grande quantidade de Dsg3 e a Dsg1 raramente se expressa². A detecção destes auto-anticorpos circulantes é, hoje, importante para o diagnóstico desta patologia¹¹.

A imunofluorescência indireta foi, durante muito tempo, a principal técnica de diagnóstico do pênfigo. No entanto, esta é incapaz de diferenciar os subtipos da doença, o que pode ser realizado através do *immunoblotting* e imunoprecipitação. Esta segunda técnica tem como limitação ser demorada, exclusivamente qualitativa e pouco prática para a utilização em um grande número de amostras^{4, 12}.

A produção laboratorial de antígenos Dsg1 e Dsg3 recombinantes, nos anos 1990, tornou possível o desenvolvimento de um teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) capaz de identificar os auto-anticorpos do pênfigo^{13, 14}. A utilização do teste ELISA para o pênfigo trouxe como vantagem sua alta sensibilidade e especificidade, simplicidade e rapidez quando comparado a outros testes sorológicos¹⁵, além de ser capaz de quantificar os auto-anticorpos, o que, segundo alguns autores, pode ser relacionado à severidade da doença^{4, 12, 16}.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de detecção dos auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 na saliva, através do teste ELISA, comparando com sua presença no soro. Buscou-se também relacionar a presença destes anticorpos com a atividade da doença e com a utilização de medicamentos para o controle desta patologia.

Métodos

Pacientes

Para esta pesquisa foi utilizada uma amostra de conveniência composta por 24 indivíduos naturais do estado de Pernambuco, Brasil. Como critério de inclusão, o paciente deveria ser portador de pênfigo vulgar ou foliáceo e este diagnóstico deveria ter sido dado através de exame histopatológico.

Os pacientes foram selecionados em três diferentes centros médico-odontológicos do

estado de Pernambuco: Clínica de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Clínica de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE e no hospital Santa Casa de Misericórdia do Recife.

Toda esta pesquisa foi realizada de acordo com os princípios éticos previstos pelas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e foi registrada no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, sob o protocolo número 291/08.

Coleta de dados

Após realizada a anamnese e exame clínico, foram coletadas, de cada paciente, amostras de saliva e sangue. Estes foram instruídos a cuspir em potes coletores estéreis durante 5 minutos. A saliva coletada foi transferida para tubos tipo *ependorf* estéreis e centrifugada a 50 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e armazenado em *freezer*, à -20°C.

Para a coleta do sangue foram utilizados tubos coletores de 9 mL sem anticoagulante, que foram levados para centrifugação a 3250 rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi transferido para tubos tipo *ependorf* estéreis e armazenado em *freezer*, à temperatura de -20°C, até o momento do teste.

Teste ELISA para o soro

O teste laboratorial foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da UFPE, e para isto foi utilizado o kit *Mesacup Dsg-1 & Dsg-3 ELISA Test System* (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japão).

A amostra inicial de soro foi diluída a uma proporção de 1:101 e seguiu-se o protocolo

como recomendado pelo fabricante e estudos anteriores^{17, 18}. A densidade óptica final das amostras foi lida a 450nm, e o equipamento ofereceu como resultado a absorbância (Abs). Este dado foi submetido à fórmula matemática, cedida pelo fabricante, cujo resultado é expresso em Unidade/mL (U/mL). Este resultado foi interpretado através da tabela de ponto de corte do *kit*, que qualifica o resultado em positivo, negativo ou indeterminado.

Teste ELISA para a saliva

O teste ELISA para a saliva seguiu o mesmo protocolo realizado para o soro, sendo alterada apenas a diluição inicial da amostra, que foi realizada a 5:101. Esta concentração foi definida por um teste piloto, sendo a concentração mais próxima da estabelecida pelo fabricante, na qual houve reação positiva.

Análise estatística

Na análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais uni e bivariadas (técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes de Mc-Nemar e Exato de Fisher (técnicas de estatística inferencial). Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) na versão 15.0. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi 5,0%.

Resultados

Os 24 pacientes estudados apresentaram idades variando entre 13 e 74 anos (idade média de 44 anos). Destes, 15 (62,5%) eram mulheres e 9 (37,5%) eram homens; 19 (79,2%) eram portadores de PV e 5 (20,8%) de PF. No momento da coleta de dados 17 (70,8%) dpacientes

apresentavam lesões ativas e a mesma quantidade estava fazendo uso de corticosteróides sistêmicos (Tabela 1).

Testes de anti-Dsg1 e anti-Dsg3 para o soro

Dentre os 19 portadores de PV pôde-se observar que a maioria (73,7%) mostrou-se positiva quanto à presença de anti-Dsg3 e 36,8% quanto à presença de anti-Dsg1; 21% não mostrou presença de qualquer anti-Dsg; e uma das amostras (5,2%) apresentou resultado positivo para a Dsg3, porém teve resultado indeterminado para a Dsg1. Nos casos de PF todas as 5 amostras (100%) reagiram positivamente apenas para a anti-Dsg1 (Tabela 2).

Testes de anti-Dsg1 e anti-Dsg3 para a saliva

Na tentativa de avaliar a presença de anti-Dsg na saliva dos pacientes portadores de pênfigo obteve-se que duas (8,3%) das amostras apresentaram positividade para o auto-anticorpo referente ao subtipo da doença (Tabela 3 e 4).

Relação entre a terapia medicamentosa e a presença de lesão ativa e a presença de anti-Dsg

Comparando-se a presença dos auto-anticorpos no soro com a utilização de medicação não foi observada relação estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Também não foi possível determinar relação entre a existência da lesão ativa e a presença sérica de anti-Dsg circulantes.

Dentre os pacientes com PV, 11 (57,9%) mostraram presença de Dsg3 mesmo estando em tratamento com corticosteróides; no caso do PF, 3 pacientes (60%) apresentaram Dsg1 quando em tratamento (Tabela 5).

Quando comparada a atividade das lesões com a presença de auto-anticorpos específicos

para a doença observou-se que, para o PV, 9 (47,4%) dos pacientes apresentaram lesões ativas e anti-Dsg3 circulantes, enquanto que 3 (60%) dos portadores de PF mostraram presença de Dsg1 (Tabela 6).

Discussão

Apesar do papel dos anticorpos contra as Dsg na patogênese do PV e PF ainda não ser bem esclarecido, estudos apontam a presença de auto-anticorpos anti-Dsg3 e anti-Dsg1 como indicadores de PV e PF, respectivamente¹⁷.

Acredita-se que os fenótipos do PV e PF estão correlacionados à resposta dos anticorpos IgG aos diferentes tipos de Dsg. Anticorpos para Dsg1 são responsáveis por lesões em pele, enquanto que anticorpos para Dsg3 estão envolvidos com lesões em membranas mucosas^{5, 12, 15}.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com estas afirmações, mostrando que na patogênese do PV podem estar envolvidos tanto auto-anticorpos para Dsg3, quanto para Dsg1, havendo uma prevalência de anti-Dsg3¹⁸. Da mesma forma, ficou clara a relação entre o pênfigo foliáceo e a presença da anti-Dsg1, concordando com resultados exibidos por Amagai et al. (1999)¹⁸.

Numa minoria dos pacientes a correlação entre o auto-anticorpo encontrado e a expressão da doença não foi como relatado por alguns autores, visto que, três pacientes com lesões orais características do pênfigo vulgar mostraram positividade exclusivamente para a anti-Dsg3. Estas discordâncias já haviam sido encontradas em pesquisas anteriores²⁰, que sugerem a possibilidade de haver outros fatores, além do tipo de Dsg envolvida, que possam influenciar na ocorrência e na localização das lesões⁵. Daneshpazhooh et al. (2007)¹⁷ relatam que estas discrepâncias podem ser explicadas através de variações genéticas ou devido à presença de

outros mecanismos envolvidos na patogênese do pênfigo. Eberhard et al. (2004)²¹ observaram uma diferença significativa entre os genes da IL-10 nos pacientes com PV quando comparado ao grupo controle, o que sugere que o polimorfismo desta citocina pode estar associado a um fator de suscetibilidade para o PV ainda desconhecido.

Quanto à presença dos anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 na saliva, esta se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,05$), corroborando com os achados de Andreadis et al. (2006)⁴ e Hallaji et al. (2009)²². Estes achados sugerem que a saliva pode ser um material biológico alternativo no diagnóstico e monitoramento do pênfigo através do teste ELISA, no entanto, algumas mudanças ainda devem ser propostas para aumentar a sensibilidade e precisão desta nova técnica.

Andreadis et al. (2006)⁴ associam a presença destes anticorpos na saliva ao fato de que lesões orais conteriam elementos inflamatórios auto-imunes. Já Hallaji et al. (2009)²² relatam que a principal imunoglobulina presente na saliva é a IgA, porém também estão presentes quantidades significativas de IgG produzidas localmente ou derivadas do soro. Estas seriam as principais hipóteses para a viabilidade de utilização da saliva na realização do teste ELISA para o pênfigo, no entanto, percebe-se que para ambas as hipóteses a concentração dos auto-anticorpos na saliva seria bem menor do que sua concentração sérica.

Nesta pesquisa buscou-se utilizar, para a saliva, a mesma metodologia proposta para o soro, por isto a diluição da saliva foi realizada a 5:101, esta foi a diluição mais próxima daquela proposta para o soro que apresentou reação antígeno-anticorpo positiva. Porém devido à baixa positividade (8,3%) sugere-se que novas tentativas sejam realizadas com concentrações mais elevadas.

Os resultados da presente pesquisa, onde todos os pacientes que estavam sem utilizar

medicamentos já haviam passado por algum tipo de tratamento anterior com corticosteróides, diferem dos achados de Harman et al. (2000)¹⁸, cujo grupo de estudo não havia ainda sido submetido a tratamento sistêmico.

Alguns autores acreditam que o ELISA para as Dsg 1 e 3 não é apenas um instrumento sensível para o diagnóstico do PV, mas que ele serve também como um meio de avaliar a severidade e monitorar a atividade da doença^{17, 23}.

Entretanto, a presença de auto-anticorpos circulantes durante períodos de remissão do pênfigo (ausência de lesões ativas) é observada tanto através do ELISA quanto da imunofluorescência indireta²⁴.

Aqui, foi possível notar que não houve relação significativa entre a atividade da doença e a presença de anticorpos circulantes, corroborando, com Harman et al. (2001)²⁵, que relatam que a presença das anti-Dsg nem sempre pode ser relacionada com a severidade da doença e, assim, não é viável de ser utilizada como forma de monitoramento do paciente.

Foram encontrados na literatura apenas dois estudos utilizando a saliva como amostra para o teste ELISA para o pênfigo, porém, ambos investigaram exclusivamente pacientes com PV. Este estudo trouxe como inovação a avaliação da eficácia desta nova técnica para pacientes com PF, os quais apresentaram resultados semelhantes aos achados para o PV.

Diante dos achados, é possível concluir que as desmogleínas 1 e 3 estão presentes na saliva e no soro dos pacientes portadores de pênfigo. Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a presença de anticorpos e a severidade da doença ou a utilização de qualquer medicação sistêmica para o seu tratamento.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências

1. Stanley JR, Koulu L, Thivolet C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *The Journal of Clinical Investigation* 1984; **74**: 313-320.
2. Yamamoto Y, Aoyama Y, Shu E, Tsunoda K, Amagai M, Kitajima Y. Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of dsg3 and differ in their dsg3-depleting activities related to pathogenicity. *J Biol Chem* 2007; **282**: 17866–17876.
3. Schmidt E, Klinker E, Opitz A, Herzog S, Sitaru C, Goebeler M, Taleghoni Bm, Brocker Eb, Zillikens D. Therapeutics Protein A immunoadsorption: a novel and effective adjuvant treatment of severe pemphigus. *Br J Dermatol* 2003; **148**: 1222–1229.
4. Andreadis D, Lorenzini G, Drakoulakos D, Belazi M, Mihailidou E, Velkos G, Mourellou-Tsatsou O, Antoniadis D. Detection of pemphigus desmoglein 1 and desmoglein 3 autoantibodies and pemphigoid BP180 autoantibodies in saliva and comparison with serum values. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 374-380.
5. Mentink LF, Jong MCJM, Kloosterhuis GJ, Zuiderveen J, Jonkman MF, Pas HH. Coexistence of IgA antibodies to desmoglein 1 and 3 in pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus and paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 635-641.
6. Veldman C, Eming R, Wolff-Franke S, Sonderstrup G, Kwok WW, Hertl M. Detection of low avidity desmoglein 3-reactive T cells in pemphigus vulgaris using HLA-DRβ1*0402 tetramers. *Clin Immunol* 2007; **122**: 330–337.
7. Yeh SW, Cavacini LA, Bhol KC, Lin MS, Kumar M, Duval M, Posner MR, Ahmed AR. Pathogenic human monoclonal antibody against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2006; **120**: 68—75.
8. Abida O, Kallel-Sellami M, Joly P, Ben Ayed M, Zitouni M, Masmoudi A, Mokni M, Fezzaa B, Ben Osman A, Kammoun MR, Gilbert D, Turki H, Tron F, Masmoudi H, Makni S. Anti-desmoglein 1 antibodies in healthy related and unrelated subjects and patients with pemphigus foliaceus in endemic and non-endemic areas form Tunisia. *JEADV* 2009; **23**: 1073-1078.

9. Sánchez-Pérez J, García-Díez A. Pemphigus. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2005; **96**: 329-356.
10. Sami N, Bhol C, Ahmed AR. Diagnostic features of pemphigus vulgaris in patients with pemphigus foliaceus: detection of both autoantibodies, long-term follow-up and treatment responses. *Clin Exp Immunol* 2001; **125**:492-498.
11. Cunha PR, Bystryń JC, Medeiros EPL, Oliveira JR. Sensitivity of indirect immunofluorescence and ELISA in detecting intercellular antibodies in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). *Int J Dermatol* 2006; **45**: 914-918.
12. Harman KE, Gratian MJ, Seed PT, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens desmoglein 1 and 3. *Clin Exp Dermatol* 2000; **25**: 236-240.
13. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Shimizu N, Nishikawa T. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997; **159**: 2010-2017.
14. Ng PPL, Thng STG, Mohamed K, Tan SH. Comparison of desmoglein ELISA and indirect immunofluorescence using two substrates (monkey oesophagus and normal human skin) in the diagnosis of pemphigus. *Australas J Dermatol* 2005; **46**: 239-241.
15. Sharma VK, Prasad HRY, Khandpur S, Kumar A. Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 2006; **45**: 518-522.
16. Oiso N, Yamashita C, Yoshioka K, Amagai M, Komai A, Nagata Y, Hashimoto T, Ishii M. IgG/IgA pemphigus with IgG and IgA antidesmoglein 1 antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Dermatol* 2002; **147**: 1012-1017.
17. Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, Mansoori P, Taheri A, Firooz A, Mortazavi H, Esmaili N, Dowlati Y. Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity. *JEADV* 2007; **21**: 1319–1324.
18. Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype. *Br J Dermatol* 2000; **143**:343-348.
19. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Imanami H, Nishikawa T. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay

- using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999; **140**: 351-357.
20. Cheng SW, Kobayashi A, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002; **147**: 261-265.
 21. Eberhard Y, Burgos E, Gagliardi J, Vullo CM, Borosky A, Pesoa S, serra HM. Cytokine polymorphisms in patients with pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2005; **296**: 309-313.
 22. Hallaji Z, Mortazavi H, Lajevardi V, Tamizifar B, AmirZargar A, Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C. Serum and salivary desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in pemphigus vulgaris: correlation with phenotype and severity. *JEADV* 2009, 1-6.
 23. Kumar B, Arora S, Kumaran MS, Jain R, Dogra S. Study of desmoglein 1 and 3 antibody levels in relation to disease severity in Indian patients with pemphigus. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006; **72**: 203-6.
 24. Kwon EJ, Yamagami J, Nishikawa T, Amagai M. Anti-desmoglein IgG autoantibodies in patients with pemphigus in remission. *JEADV* 2008; **22**: 1070-1075.
 25. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001; **144**: 775-780.

Tabelas

Tabela 1 – Caracterização dos pacientes segundo o tipo de doença, uso de medicação e ocorrência de lesão ativa

Variável	n	%
• Doença		
PV	19	79,2
PF	5	20,8
• Medicação		
Sim	17	70,8
Não	7	29,2
• Lesão ativa		
Sim	17	70,8
Não	7	29,2
TOTAL	24	100,0

Tabela 2 – Avaliação dos auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 no soro e na saliva no PV e PF

Dsg	Doença						Valor de p
	PV		PF		Grupo Total		
	n	%	n	%	n	%	
• Dsg1							
Soro							
Positivo	7	36,8	5	100,0	12	50,0	p ⁽¹⁾ = 0,037*
Negativo	12	63,2	-	-	12	50,0	
Saliva							
Positivo	-	-	1	5,3	1	4,2	p ⁽¹⁾ = 1,000
Negativo	18	94,7	5	100,0	23	95,8	
• Dsg3							
Soro							
Positivo	14	73,7	-	-	14	58,3	p ⁽¹⁾ = 0,006*
Negativo	5	26,3	5	100,0	10	41,7	
Saliva							
Postivo	1	5,3	-	-	1	4,2	p ⁽¹⁾ = 1,000
Negativo	18	94,7	5	100,0	23	95,8	
TOTAL	19	100,0	5	100,0	24	100,0	

(*): Associação significativa a 5,0%.

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Tabela 3 – Distribuição da presença da anti-Dsg1 no soro e na saliva

<i>Dsg1 - soro</i>	<i>Dsg1 - saliva</i>						Valor de p
	Positivo		Negativo		TOTAL		
	n	%	n	%	n	%	
Positivo	-	-	12	50,0	12	50,0	p ⁽¹⁾ = 0,003*
Negativo	1	4,2	11	45,8	12	50,0	
TOTAL	1	4,2	23	95,8	24	100,0	

(*): Diferença significativa.

(1): Através do teste de Mc-Nemar.

Tabela 4 – Distribuição da presença da anti-Dsg3 no soro e na saliva

<i>Dsg3 - soro</i>	<i>Dsg3 - saliva</i>						Valor de p
	Positivo		Negativo		TOTAL		
	n	%	n	%	n	%	
Positivo	13	54,2	1	4,2	14	58,3	p ⁽¹⁾ < 0,001*
Negativo	10	41,7	-	-	10	41,7	
TOTAL	23	95,8	1	4,2	24	100,0	

(*): Diferença significativa.

(1): Através do teste de Mc-Nemar.

Tabela 5 – Distribuição auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 no soro e na saliva de acordo com o uso de medicação

Dsg	Medicação				Grupo Total		Valor de p	
	Sim		Não					
	n	%	n	%	n	%		
• Dsg1								
Soro							p ⁽¹⁾ = 1,000	
Positivo	8	47,1	4	57,1	12	50,0		
Negativo	9	52,9	3	42,9	12	50,0		
Saliva							p ⁽¹⁾ = 1,000	
Positivo	1	5,9	-	-	1	4,2		
Negativo	16	94,1	7	100,0	23	95,8		
• Dsg3								
Soro							p ⁽¹⁾ = 0,393	
Positivo	11	64,7	3	42,9	14	58,3		
Negativo	6	35,3	4	57,1	10	41,7		
Saliva							p ⁽¹⁾ = 1,000	
Positivo	1	5,9	-	-	1	4,2		
Negativo	16	94,1	7	100,0	23	95,8		
TOTAL	17	100,0	7	100,0	24	100,0		

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Tabela 6 – Distribuição dos auto-anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 no soro e na saliva de acordo com a ocorrência de lesão ativa

Dsg	Lesão ativa						Valor de p
	Sim		Não		Grupo Total		
	n	%	n	%	n	%	
• Dsg1							
Soro							
Positivo	8	47,1	4	57,1	12	50,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
Negativo	9	52,9	3	42,9	12	50,0	
Saliva							
Positivo	1	5,9	-	-	1	4,2	p ⁽¹⁾ = 1,000
Negativo	16	94,1	7	100,0	23	95,8	
• Dsg3							
Soro							
Positivo	10	58,8	4	57,1	14	58,3	p ⁽¹⁾ = 1,000
Negativo	7	41,2	3	42,9	10	41,7	
Saliva							
Positivo	1	5,9	-	-	1	4,2	p ⁽¹⁾ = 1,000
Negativo	16	94,1	7	100,0	23	95,8	
TOTAL	17	100,0	7	100,0	24	100,0	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº. do protocolo do estudo: _____

Estamos entregando a você um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após sua leitura caberá a você assinar ou não este documento com o objetivo de aceitar ou não a sua participação na pesquisa.

Título: Detecção de auto-anticorpos anti-desmogleína 1 e 3 através do teste ELISA na saliva e soro de pacientes portadores de pênfigo.

Pesquisadora: Camila de Andrade Lima Arcoverde

A pesquisadora responsável pelo estudo responderá a qualquer pergunta que você possa ter sobre este documento e sobre o estudo. Por favor, leia com cuidado e não tenha medo ou vergonha de perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.

Propósito: O pênfigo é uma doença grave, sem cura, que causa bolhas e grandes aftas na pele e na boca dos doentes. Quando não é tratado, o pênfigo pode matar. Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa com o objetivo de utilizar o teste ELISA, que é um teste imunoenzimático usado para a detecção de anticorpos presentes no plasma sanguíneo para ver se existe auto-anticorpos anti-desmogleína 1 e 3 que são os causadores da doença pênfigo na saliva e comparar com a quantidade destes no sangue.

Descrição do estudo: Irão participar do estudo pacientes portadores de pênfigo e indivíduos livres de qualquer doença de origem semelhante. Destas pessoas serão coletadas amostras de 9 mL de sangue, por um profissional especializado de acordo com as normas de biossegurança, na tentativa de diminuir o desconforto, como vermelhidão e edema causados durante a injeção, também será coletado saliva de modo não-estimulado em um pote coletor estéril durante 5 minutos, as quais serão submetidas ao teste ELISA.

Riscos e benefícios: Espera-se que as pessoas que participarem da pesquisa tenham como benefício a confirmação do diagnóstico, positivo ou negativo, através de um teste laboratorial bastante moderno. E, através do ELISA os médicos poderão avaliar se os remédios utilizados estão fazendo o efeito esperado, para, assim, melhorar a qualidade de vida dos seus pacientes. No momento da coleta de sangue o paciente estará exposto a alguns inconvenientes como dor, possibilidade de formação de inchaço e alguns pacientes poderão sentir algum desconforto emocional. Alguns pacientes poderão se sentir exposto a constrangimento ao realizar a coleta de saliva. No entanto esta pesquisa é um trabalho científico e será realizada de forma a minimizar estes riscos.

Confidencialidade dos registros: Você tem direito a privacidade das informações encontradas, respeitando valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. Como condição de sua participação nesta pesquisa, você permitirá o acesso aos dados obtidos durante o estudo aos pesquisadores e aos membros da Comissão de Ética, responsáveis pela análise do projeto. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou em publicações científicas, mas sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

Direito em participar, recusar ou sair: Ao participar você concorda em cooperar com os procedimentos que serão executados e que foram descritos acima, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado. Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento. Da mesma forma, o responsável pelo estudo poderá decidir pela interrupção de sua participação no estudo baseado em critérios técnicos.

Desta forma, eu, _____, li a descrição do estudo que foi explicado dentro da minha compreensão. Compreendo que minha participação é voluntária. Confirmo também que aceito de livre e espontânea vontade participar deste estudo.

Assinatura do paciente _____

Assinatura da testemunha 1 _____

Assinatura da testemunha 2 _____

Assinatura do pesquisador _____

Recife, _____ de _____ de _____

Contato da pesquisadora:

Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901,

Tel.: (81)2126-8817/ (81)9635-0122, E-mail: camila.arcoverde@gmail.com

APÊNDICE B**FICHA CLÍNICA****IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

Protocolo número: _____

Nome: _____

Sexo: M () F () Data de nascimento: ____/____/____ Profissão: _____

Endereço: _____ Nº: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Tel.: _____

ANAMNESE

É portador de pênfigo?	Sim ()	Não ()
Há quanto tempo?		
É portador de alguma outra desordem auto-imune?	Sim ()	Não ()
Qual?		
Está tomando alguma medicação?	Sim ()	Não ()
Qual?		
Sente algum incômodo?	Sim ()	Não ()
Como?		
Onde?		

EXAME FÍSICO

Apresenta lesão?	Sim ()	Não ()
Localização		
Aspecto		

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 035/2009 - CEP/CCS

Recife, 19 de Fevereiro de 2009

Registro do SISNEP FR - 222689

CAAE - 0262.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 291/08

Título: "Detecção de Auto-Anticorpos Anti-Desmogleína 1 e 3 Através do Teste Elisa na Saliva e Soro de Pacientes Portadores de Pênfigo".

Pesquisador Responsável: Camila de Andrade Lima Arcoverde

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 18 de fevereiro de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório no final da pesquisa (30/04/2010).

Atenciosamente

Prof. Gerardo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

A
Mestranda Camila de Andrade Lima Arcoverde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia - CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br

ANEXO B

NORMAS DA REVISTA *THE JOURNAL OF DERMATOLOGY*

Top Author Guidelines

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Latest information:

- Online submission is now available at <http://mc.manuscriptcentral.com/jde>.

AIMS AND SCOPE

The Journal of Dermatology is the official English language journal of the Japanese Dermatological Association and the Asian Dermatological Association, and publishes original articles of a clinical or research nature. Reviews are also invited. Letters to the editor of two printed pages or less will be published as soon as possible. Papers in any field of dermatology will be considered.

EDITORIAL REVIEW AND ACCEPTANCE

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are double-blind peer reviewed by two anonymous reviewers and the Editor. Final acceptance or rejection rests with the Editorial Board, who reserves the right to refuse any material for publication.

Manuscripts should be written so that they are intelligible to the professional reader who is not a specialist in the particular field. They should be written in a clear, concise, direct style. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of content, the Editor and the Publisher reserve the right to modify typescripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the author for revision.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jde>.

Authors must supply an email address as all correspondence will be by email. Two files should be supplied: the covering letter and the manuscript (in Word or rich text format (.rtf)). The covering letter should be uploaded as a file not for review. All articles submitted to the Journal must comply with these instructions. Failure to do so will result in return of the manuscript and possible delay in publication.

- Submissions should be double-spaced.

- All margins should be at least 30 mm.
- All pages should be numbered consecutively in the top right-hand corner, beginning with the title page.
- Do not use Enter at the end of lines within a paragraph.
- Turn the hyphenation option off; include only those hyphens that are essential to the meaning.
- Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.
(Greek beta).
- Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for β
- Use a tab, not spaces, to separate data points in tables. If you use a table editor function, ensure that each data point is contained within a unique cell (i.e. do not use carriage returns within cells).

Each figure should be supplied as a separate file, with the figure number incorporated in the file name. For submission, low-resolution figures saved as .jpg or .bmp files should be uploaded, for ease of transmission during the review process. Upon acceptance of the article, high-resolution figures (at least 300 d.p.i.) saved as .eps or .tif files should be uploaded. Digital images supplied only as low-resolution files cannot be used.

Further instructions are available at the submission site.

For Assistance, please contact to the Editorial office of Journal of Dermatology at the address below:

Japanese Dermatological Association, Journal of Dermatology Editorial Office
Cosmos-Hongo Bldg, 1-4 Hongo-4-chome
Bunkyo-ku Tokyo 113-0033
Japan
Email: gakkai@dermatol.or.jp
Tel: +81 3 3811 5099; Fax: +81 3 3812 6790.

Covering letter

Papers are accepted for publication in the Journal on the understanding that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium. This must be stated in the covering letter.

The covering letter must also contain an acknowledgment that all authors have contributed significantly, and that all authors are in agreement with the content of the manuscript. In keeping with the latest guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors, each author's contribution to the paper is to be quantified.

Authors must declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest by disclosing at the time of submission any financial arrangements they have with a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or with a company making a competing product. Such information will be held in confidence while the paper is under review and will not influence the editorial decision but, if the article is accepted for publication, the Editor will

usually discuss with the authors the manner in which such information is to be communicated to the reader.

If tables or figures have been reproduced from another source, a letter from the copyright holder (usually the Publisher), stating authorization to reproduce the material, must be attached to the covering letter.

Author material archive policy

Authors who require the return of any submitted material that is accepted for publication should inform the Editorial Office after acceptance. If no indication is given that author material should be returned, the Publisher will dispose of all hardcopy and electronic material two months after publication.

ETHICAL CONSIDERATIONS

Authors must state that the protocol for the research project has been approved by a suitably constituted Ethics Committee of the institution within which the work was undertaken and that it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Tokyo 2004), available at <http://www.wma.net/en/10home/index.html>. *The Journal of Dermatology* retains the right to reject any manuscript on the basis of unethical conduct of either human or animal studies.

All investigations on human subjects must include a statement that the subject gave informed consent. Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used).

Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to national guidelines for animal usage in research.

COPYRIGHT

Authors publishing in the Journal will be asked to sign a Copyright Assignment Form. In signing the form it is assumed that authors have obtained permission to use any copyrighted or previously published material. All authors must read and agree to the conditions outlined in the form, and must sign the form or agree that the corresponding author can sign on their behalf. Articles cannot be published until a signed form has been received. Authors can download the form from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/jde_caf.pdf.

STYLE OF THE MANUSCRIPT

Manuscripts should follow the style of the Vancouver agreement detailed in the International Committee of Medical Journal Editors' revised 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication', as presented at <http://www.ICMJE.org>.

Spelling. The Journal uses US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the *Merriam-Webster's Collegiate Dictionary*.

Units. All measurements must be given in SI or SI-derived units. Please go to the Bureau

International des Poids et Mesures (BIPM) website at <http://www.bipm.fr> for more information about SI units.

Abbreviations. Abbreviations should be used sparingly - only where they ease the reader's task by reducing repetition of long, technical terms. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.

Trade names. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name, and the name and location of the manufacturer, in parentheses.

Scientific names. Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. However, for well-known species, the scientific name may be omitted from the article title. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

PARTS OF THE MANUSCRIPT

Manuscripts should be presented in the following order: (i) title page, (ii) abstract and key words, (iii) text, (iv) acknowledgments, (v) references, (vi) appendices, (vii) figure legends, (viii) tables (each table complete with title and footnotes) and (ix) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

- Original article: up to 6000 words including abstract (excluding references), the number of tables and figures is not limited.
- Letter to the Editor: up to 1000 words (including 10 references), and up to 2 figures or tables in total, no abstract.

Title page

The title page should contain (i) the title of the paper, (ii) the full names of the authors and (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with (iv) the full postal and email address, plus facsimile and telephone numbers, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent. The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote.

The title should be short, informative and contain the major key words. Do not use abbreviations in the title. A short running title (less than 40 characters) should also be provided.

Abstract and key words

All articles must have a brief abstract that states in 200-300 words the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. The abstract should not contain abbreviations or references.

Five key words, for the purposes of indexing, should be supplied below the abstract, in alphabetical order, and should be taken from those recommended by the US National Library of

Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at
<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>.

Text

Authors should use the following subheadings to divide the sections of their manuscript: Introduction, Methods, Results and Discussion.

Acknowledgments

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Personal thanks and thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

References

The Vancouver system of referencing should be used (examples are given below). In the text, references should be cited using superscript Arabic numerals in the order in which they appear. If cited in tables or figure legends, number according to the first identification of the table or figure in the text.

In the reference list, cite the names of all authors when there are six or fewer; when seven or more, list the first three followed by *et al.* Do not use *ibid.* or *op cit.* Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Smith A, 2000, unpublished data). All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list.

Names of journals should be abbreviated in the style used in *Index Medicus*.

Authors are responsible for the accuracy of the references.

Standard journal article

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; **124**: 980-983.

Standard journal article using DOI; articles published online in advance without volume, issue, or page number (More information about DOIs: <http://www.doi.org/faq.html>):

2 Sonobe T, Kiyosawa N, Tsuchiya K, et al. Prevalence of coronary artery abnormality in incomplete Kawasaki disease. *Pediatr. Int.* Published online: 6 June 2007; doi: 10.1111/j.1442-200X.2007.02396.x

Book

2 Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and Leadership Skills for Nurses*, 2nd edn. Albany, NY: Delmar Publishers, 1996.

Chapter in a Book

3 Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, eds.

Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management, 2nd edn. New York: Raven Press, 1995; 465-478.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Number tables consecutively in the text in Arabic numerals. Type tables on a separate page with the legend above. Legends should be concise but comprehensive - the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for *P*-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figures

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Line figures should be supplied as sharp, black and white graphs or diagrams, drawn professionally or with a computer graphics package; lettering should be included. Individual images forming a composite figure should be of equal contrast, to facilitate printing, and should be accurately squared. Images need to be cropped sufficiently to prevent the subject being recognized, or an eye bar used. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration. Images should be supplied as high resolution (at least 300 d.p.i.) files, saved as .eps or .tif format. Digital images supplied only as low-resolution print-outs and/or files cannot be used.

Figure legends

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensive - the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Word 2007

Will authors please note that Word 2007 is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the Journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Please use Word's 'Save As' option therefore to save your document as an older (.doc) file type.

PROOFS

It is essential that corresponding authors supply an email address to which correspondence can be emailed while their article is in production.

Notification of the URL from where to download a Portable Document Format (PDF) typeset page proof, associated forms and further instructions will be sent by email to the corresponding author. The purpose of the PDF proof is a final check of the layout, and of tables and figures.

Alterations other than the *essential* correction of errors are unacceptable at PDF proof stage. The proof should be checked, and approval to publish the article should be emailed to the Publisher by the date indicated; otherwise, it may be signed off on by the Editor or held over to the next

issue.

OFFPRINTS

A minimum of 50 offprints will be provided upon request, at the author's expense. These paper offprints may be ordered online. Please visit <http://offprint.cosprinters.com>, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields.

If you have queries about offprints, please email offprint@cosprinters.com.

PUBLICATION FEES

A publication fee of ¥5,000/US\$50 is required per printed page. A form requesting payment will be available for download with your PDF proof.

COLOR FIGURE CHARGE

Color figures will be published free of charge if judged relevant and of good quality.

ONLINE GUIDELINES

Visit the *The Journal of Dermatology* home page at <http://www.blackwellpublishing.com/jde> for more information, and Blackwell Publishing's web pages for submission guidelines and digital graphics standards at http://authorservices.wiley.com/prep_illust.asp. The Journal of Dermatology is available online at Wiley InterScience. Visit www.interscience.wiley.com to search the articles and register for table of contents and email alerts.

Author Services enables authors to track their article, once it has been accepted, through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production so they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources, including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

EARLYVIEW

EarlyView articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *EarlyView* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *EarlyView* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *EarlyView* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be

used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at:
<http://www.doi.org/faq.html>

Contact:

Prof S. Shimada, Editor-in-Chief, *The Journal of Dermatology*

Cosmos-Hongo Bldg, 1-4 Hongo-4-chome

Bunkyo-ku Tokyo 113-0033

Japan

Email: gakkai@dermatol.or.jp

Tel: +81 3 3811 5099; Fax: +81 3 3812 6790.

