

PEMFIGO

La parola pemfigo deriva dal greco “phemphix” che si traduce con “bolla”. Con questo termine si fa riferimento ad un gruppo di malattie croniche epiteliali bollose, in cui la produzione di autoanticorpi IgG contro i domini extracellulari delle proteine di membrana dei cheratinociti risulta in una **acantolisi** – cioè una perdita di adesione cellulare dei cheratinociti che si presenta come un distacco soprabasale.

In particolare, nel pemfigo, gli anticorpi sono caratteristicamente rivolti contro

- Desmogenina 1
- Desmogleina 3

La desmogleina (Dsg) è una proteina che fa parte della famiglia delle caderine, componente dei desmosomi responsabile dell'adesione intercellulare negli epitelii squamosi stratificati, come l'epitelio orale e la pelle.

I diversi sottotipi della malattia comprendono:

Pemfigo volgare (PV), che comprende 3 sottotipi ulteriori:

- Tipo mucoso dominante
- Tipo muco-cutaneo
- Tipo cutaneo

IgG controDsg-3

	IgG controDsg-3 e Dsg-1
	IgG controDsg-1
Pemfigo foliaceo (PF)	IgG contro Dsg-1
Pemfigo paraneoplastico	IgG controDsg-3 e Dsg-1 + dermatite di interfaccia
Pemfigo vegetante – variante del PV	IgG controDsg-3
Pemfigo eritematoso – variante del PF	IgG controDsg-1
Fogo selvagem – variante del PF	IgG controDsg-1
Pemfigo erpetiforme	IgG controDsg-1
Indotto da farmaci	Simile al PF
Pemfigo ad IgA	IgA contro Dsg

Si tratta, quindi, di malattie bollose caratterizzate clinicamente dalla formazione di bolle flaccide ed erosioni delle membrane mucose e della pelle.

Fattori genetici:

Tutti i tipi di pemfigo sembrano essere associati a un particolare background genetico.

Fattori ambientali:

I fattori genetici non sono gli unici elementi implicati nell'insorgenza del pemfigo, infatti dei determinanti ambientali sembrano avere un ruolo nello scatenare la patologia:

- Alcuni farmaci, in particolare quelli contenenti il gruppo tiolo (come la penicillamina e il captopril) che sembrano promuovere l'acantolisi, ma ci sono anche farmaci non-tioliche come la rifampicina, il diclofenac e altri ACE-inibitori
- Virus (HSV)
- Dieta (aglio)
- Stress psicologici e fisici
- Pesticidi
- Estrogeni

PEMFIGO VOLGARE (PV), è la forma più comune (rappresenta il 70% di tutte le forme di pemfigo)

Le bolle si sviluppano negli **strati profondi dell'epitelio, subito sopra la membrana basale**.

- **Tipo mucoso dominante**

In cui autoanticorpi IgG diretti contro Dsg-3 determinano la formazione di bolle negli **strati profondi** della mucosa orale

- **Tipo muco-cutaneo**

In cui gli anticorpi IgG diretti contro Dsg-3 e Dsg-1 determinano la formazione di bolle negli **strati profondi** della mucosa orale e dell'epidermide

- **Tipo cutaneo**

In cui gli autoanticorpi IgG diretti contro Dsg-1 determinano la formazione di bolle negli **strati profondi** dell'epidermide

Epidemiologia: è la forma più comune, con una incidenza di 0,5 su 1 milione di persone.

Colpisce preferenzialmente donne e gli adulti con un picco di insorgenza nella 4°-6° decade di vita. (alcuni articoli dicono che non c'è predilezione di sesso). Il pemfigo volgare giovanile è estremamente raro e colpisce i soggetti nella 3° decade di vita.

La patologia è associata ad elevata mortalità: prima dell'avvento dei corticosteroidi la mortalità a 5 anni era del 50%, a causa delle complicazioni secondarie quali infezioni e malnutrizione. Dopo l'introduzione del trattamento con corticosteroidi la mortalità si è ridotta al 10%, nonostante però sia aumentata la morbilità a causa della terapia cronica con immunosoppressori. Inoltre, è stato osservato che in questi pazienti le cause di morte più frequenti ci sono la polmonite, la sepsi, le malattie cardiovascolari e l'ulcera peptica.

L'eziologia del pemfigo è sconosciuta. I fattori probabilmente implicati sono di tipo genetico, agenti ambientali, infezioni, farmaci e tumori.

Genetica:

molti studi hanno dimostrato che il pemfigo è una malattia poligenica, infatti è stata osservata una forte associazione tra il pemfigo volgare e gli alleli HLA-DRB1*0402 (ebrei Ashkenazi), HLA-DRB1*1401, HLA-DQB1*0503. Infatti, il PV ha una prevalenza aumentata in diversi gruppi etnici, quali ebrei, iracheni, indiani e iraniani.

Clinica:

Classicamente (nel 70% dei casi), le lesioni cominciano a presentarsi nella mucosa orale e possono poi estendersi alle altre mucose (congiuntivale, del setto nasale, genitali) ed, infine, alla pelle (epitope spreading). Nel 20% dei casi le lesioni iniziali si possono presentare alle mucose genitali.

Epitope spreading:

Durante il decorso della malattia si formano progressivamente anticorpi contro più di un determinante antigenico, cioè con il progredire della malattia, il danno tissutale causato dagli anticorpi primari determina uno "smascheramento" delle proteine vicine verso le quali si producono anticorpi secondari.

Raramente, all'esordio si possono accompagnare erosioni della congiuntiva – non c'è fibrosi, che invece è caratteristica del pemfigoide

Il precoce coinvolgimento della mucosa orale consiste nella formazione di bolle flaccide, specialmente nella mucosa gengivale, che si rompono facilmente lasciando erosioni dolorose, le quali possono potenzialmente portare a perdita di peso e malnutrizione. Generalmente, però, bolle intatte sono difficili da trovare nel cavo orale, mentre più facilmente si osservano erosioni dolorose con residui della bolla alla periferia.

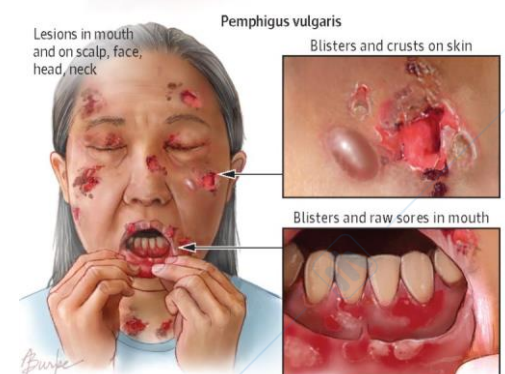
Le lesioni gengivali sono meno comuni e all'esordio possono presentarsi come piccole bolle isolate e/o erosioni, principalmente localizzate alla gengiva libera, difficili da diagnosticare come lesioni bollose. In fasi avanzate, invece, si può configurare il quadro di una gengivite erosiva o desquamativa.

Oltre alla mucosa orofaringea (palato, guance, gengiva), altre membrane mucose possono essere affette con una minore frequenza (come il rivestimento della laringe, dell'esofago, labbra, la congiuntiva, il naso, i genitali e l'ano). Il coinvolgimento dell'esofago è raro. Le lesioni ungueali sono caratteristiche del periodo di passaggio dalla mucosa alla cute (sono rare le manifestazioni ungueali precoci e, in genere, indicano severità della patologia)

Le lesioni cutanee, che frequentemente colpiscono le zone seborroiche della testa, del tronco superiore e dell'inguine, sono caratterizzate da bolle flaccide che lentamente guariscono formando erosioni crostose: quando diventa cutanea progredisce in pochi mesi.

Un numero consistente di pazienti con pemfigo volgare può avere una ricaduta e iniziare a presentare il fenotipo del pemfigo foliaceo, in particolare dopo periodi di lunga remissione.

I pazienti affetti presentano sintomi quali alterazione-riduzione del consumo dei pasti, nella deglutizione e nella conversazione. Sintomi di accompagnamento possono essere scialorrea (ipersalivazione o ptilismo), saliva sanguinante e alitosi.





Diagnosi:

Le iniziali lesioni mucose possono essere diagnosticate come infezione erpetica, aftosi, candidosi orale, lichen planus o gengivite.

Il segno di Nikolsky può essere positivo nella fase attiva della malattia.

PEMFIGO FOLIACEO (PF), la seconda forma più comune (rappresenta il 20-30% di tutte le forme di pemfigo)

In questo sottotipi sono prodotti IgG diretti contro Dsg-1 responsabili della formazione di bolle negli **strati superficiali** dell'epidermide, principalmente nello strato granulare-spinoso (acantolisi alta). L'assenza di Dsg-3 rappresenta il motivo per cui clinicamente non c'è coinvolgimento della mucosa

Epidemiologia: è la seconda forma più comune, ma è più frequente in Sudamerica e Nord-Africa (forma endemica: in Brasile è 20 volte più frequente). Colpisce prevalentemente giovani adulti con un picco tra la 2°-3° decade, con predilezione di sesso che varia tra le diverse regioni.

Ha una prognosi migliore rispetto al PV, ma ha un decorso cronico e benigno che può persistere per mesi o anni.

Il pemfigo foliaceo ha una diversa incidenza nelle varie regioni perché in alcune ha un carattere **endemico**, mentre in altre ha un carattere **sporadico** (tipo Cazenave).

La forma sporadica e quella endemica (fogo selvagem) condividono la clinica, l'istologia e l'immunologia.

Clinica:

Tipicamente, il pemfigo foliaceo non colpisce le aree mucose. Generalmente, i pazienti si presentano con erosioni crostose, pruriginose e squamose (ricoperte di incrostazioni) con chiazze circoscritte traballanti, principalmente nelle aree seborroiche. Le lesioni, se non trattate, possono progredire e portare all'eritrodemia, accompagnato da prurito e bruciore cutaneo.

Le bolle flaccide sono raramente osservate a causa della loro localizzazione superficiale e della conseguente rottura.

Diagnosi:

Il segno di Nikolsky può essere positivo nella fase attiva della malattia.

FOGO SELVAGEM – variante endemica del pemfigo foliaceo

Nelle aree rurali del Brasile, in particolare a Limao Verde, è endemico il pemfigo foliaceo. I soggetti colpiti sono giovani adulti. (giovani lavoratori all'aria aperta che vivono in condizioni di scarsa igiene, prevalentemente in foreste adiacenti a fiumi)

Comorbilità di pemfigo volgare e foliaceo:

Molti studi hanno dimostrato l'associazione tra questi sottotipi di pemfigo e le malattie autoimmuni, come la sindrome di Sjogren, il LES, l'alopecia areata, artrite reumatoide.

In un recente studio il PV è stato associato al cancro dell'orofaringe, gastrointestinale, del colon e con patologie ematologiche.

Il PF è stato, invece, associato a neoplasie della pelle non-melanoma.

Recentemente, è stato osservato un aumento di prevalenza di patologie neurologiche (quali Parkinson, demenza ed epilessia) nei pazienti affetti da pemfigo.

PEMFIGO PARANEOPLASTICO

Questo sottotipo si distingue dagli altri in quanto è una forma di pemfigo associata ad una neoplasia, occulta o conosciuta – generalmente un disordine linfoproliferativo, linfoma non-Hodgkin e leucemia mieloide cronica.

È caratterizzato dalla compresenza di una risposta autoimmunitaria umorale e cellulare (probabilmente causata dalla tempesta immunologica conseguente alla neoplasia), la quale provoca la formazione di bolle, negli strati profondi sia a livello cutaneo che mucoso, provocate da anticorpi IgG rivolti contro Dsg-3 e Dsg-1, in combinazione con una dermatite di interfaccia (questa si manifesta con una vacuolizzazione delle cellule basali, apoptosi dei cheratinociti, cellule discheratosiche, infiammazione alla giunzione dermo-epidermica) o con una reazione lichenoidale orale severa, provocata dalla reazione autoimmune delle cellule T (CD8+ citotossiche).

Questi pazienti, spesso, producono anche anticorpi contro altri antigeni, come ad esempio la proteina 1 simile- α 2macroglobulina (inibitore di proteasi) e diverse proteine citoplasmatiche della famiglia delle plachine e delle plectine – polimorfismo antigenico

Diagnosi:

Per fare la diagnosi di pemfigo paraneoplastico è necessario siano presenti, oltre al disordine linfoproliferativo, anche l'IIF su vescica di topo, e la presenza di anticorpi anti-periplachina e anti-envoplachina valutati con immunoblotting o immunoprecipitazione.

Istopatologia

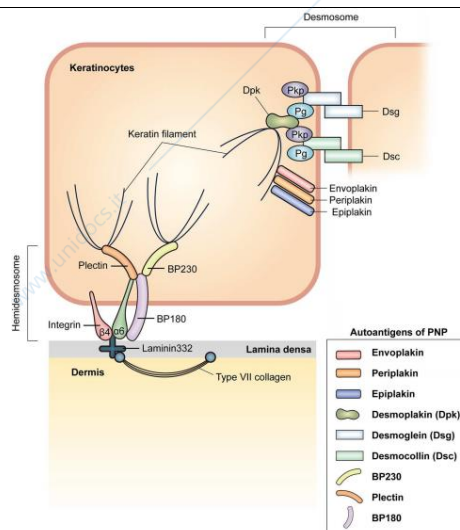
Acantolisi soprabasale con cleft, necrosi dei cheratinociti (discheratosi), dermatite d'interfaccia, banda lichenoidale sulla giunzione dermo-epidermica.

Immunofluorescenza

- diretta (DIF)
anticorpi IgG e anti-C3 negli spazi intracellulari dell'epidermide e nella membrana basale (BPAG 1 e 2)
- indiretta (IIF): siero del paziente + epitelio di vescica di topo
colorazione intercellulare

Test sierologici e immunoblotting

Sebbene l'immunoprecipitazione sia molto sensibile e specifica per gli anticorpi anti-plachina è poco accessibile; l'alternativa è l'immunoblotting che può essere effettuato usando un estratto di cheratinociti umani in coltura per trovare: desmogleina 3 di 130 kDa, desmoplachina 1 di 250 kDa, BP230, desmoplachina 2 di 210 kDa, **envoplachina di 210 kDa**, plectina di >400 kDa, **periplachina di 190 kDa**, epiplachina



Neoplasia

In ordine di frequenza: linfoma non-Hodgkin, leucemia linfocitica cronica, malattia di Castleman, carcinoma, timoma, sarcoma (liposarcoma, leiomiomasarcoma, sarcoma a cellule reticolari), macroglobulinemia di Waldenstrom, linfoma di Hodgkin, gammopatia monoclonale, melanoma

Epidemiologia: sono stati riportati 300 casi in tutta la letteratura. Ha una età media di insorgenza tra i 45-70 anni, con uguale prevalenza in entrambi i sessi.

La prognosi è molto sfavorevole, infatti è associato ad una mortalità che va dal 75 al 90%.

Clinica:

l'hallmark clinico del pemfigo paraneoplastico è rappresentato dalla stomatite con erosioni, ulcerazioni (infiammazione di bocca e labbra) emorragica refrattaria a terapia, persistente e dolorosa, che coinvolge principalmente il **vermiglio** (margini tra le labbra e la pelle adiacente) e i bordi laterali della lingua, ma caratteristicamente ha interessamento **oculare** – sedi caratteristiche labbra e occhi

Rispetto al pemfigo volgare, quello paraneoplastico è caratterizzato da un coinvolgimento più diffuso della mucosa orale, un più frequente coinvolgimento di altre mucose (come la congiuntiva) e di piante e palmi, ma non del cuoio capelluto.

Le lesioni cutanee coinvolgono principalmente le regioni superiori del corpo e si presentano, generalmente, dopo l'insorgenza delle lesioni orali. A livello della pelle le lesioni mostrano fenotipi eterogenei, incluse bolle polimorfe, erosioni, papule, lesioni target, lesioni lichenoidi, croste e pustole.

Queste lesioni possono essere associate ad un segno di Nikolsky positivo.

Considerato che questa forma di pemfigo è associata a una neoplasia clinicamente occulta o manifesta, e ad una bronchiolite obliterante, è raccomandato un check-up completo con CT di addome, torace e pelvi.

In virtù delle diverse caratteristiche cliniche si può anche definire il pemfigo paraneoplastico una **sindrome autoimmune**.

La complicità più grave del pemfigo paraneoplastico è la bronchiolite obliterante, caratterizzata da infiammazione che determina obliterazione dei bronchioli terminali, fino alla morte per insufficienza respiratoria

PEMFIGO VEGETANTE – variante del pemfigo volgare

Presenta vegetazioni fungoidi: le aree erose non guariscono in maniera classica, infatti le erosioni delle zone dove la pelle si piega (intertriginose) possono trasformarsi in lesioni vegetanti (crescita abnorme dei cheratinociti con aspetto granulare papillomatoso)

PEMFIGO ERITEMATOSO – variante del pemfigo foliaceo

Con coinvolgimento localizzato alla faccia, al petto e alla schiena.

PEMFIGO ERPETIFORME

Sono stati descritti più di 100 casi. I soggetti più colpiti hanno un'età compresa tra i 50 e i 60 anni, ma sono stati descritti casi di pazienti pediatrici.

Si presenta clinicamente con vescicole e pustole a livello del tronco e delle estremità prossimali – somiglia alla dermatite erpetiforme

Il coinvolgimento mucoso è raro.

Molti pazienti hanno subito progressione verso il PV.

INDOTTO DA FARMACI, simile al pemfigo foliaceo

L'incidenza di 1:100.000; dopo sospensione della terapia si risolve nel 30% dei casi.

PEMFIGO ad IgA

È caratterizzato principalmente da pustole, piuttosto che da bolle flaccide, a livello del tronco, delle estremità prossimali e dove la pelle si piega. Il coinvolgimento mucoso è raro.

Il pemfigo ad IgA molto spesso è associato a gammopatie e disordini ematologici.

La diagnosi si fa con la DIF della pelle perilesionale (depositi di IgA sulla superficie dei cheratinociti in un pattern simile ad una rete di pescatore) e con la IIF (in cui il siero del paziente mostra IgA che legano la superficie delle cellule epiteliali dell'esofago di scimmia con un pattern a rete di pescatore).

Si possono distinguere due forme:

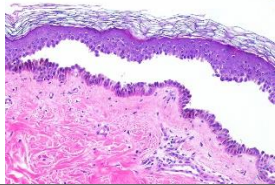
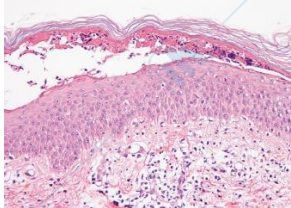
- Malattia intraepidermica neutrofila, con anticorpi IgA contro Dsg-1 e Dsg-3
- Dermatosi subcornea pustolosa, in cui ci sono anticorpi IgA contro la Dsc1 (desmocollina-1)

Diagnosi:

Clinica, descritta per ogni tipo di pemfigo

Istopatologia

Il campione bioptico della lesione prelevato da un soggetto con pemfigo (qualsiasi sottotipo) presenta **acantolisi** (perdita di ponti intercellulari che risulta nella perdita della connessione tra i cheratinociti) come conseguenza della perdita di adesione dei cheratinociti, che può progredire fino a formare bolle. L'acantolisi ha una diversa sede a seconda del sottotipo di pemfigo:

Pemfigo volgare	Soprabasale (a livello dello strato spinoso) Acantolisi bassa	
Pemfigo foliaceo	superficiale (subcornea) acantolisi alta	

Nel pemfigo volgare si può anche osservare un effetto “tombstone-lapide” nel pavimento della bolla, caratterizzato dalla presenza di cheratinociti basali residui nella zona della membrana basale. Nonostante le bolle cutanee, sia nel pemfigo volgare che in quello foliaceo, non siano infiammatorie, occasionalmente si può osservare un lieve infiltrato di eosinofili e neutrofili nel derma alto e nell’epidermide.

Il pemfigo vegetante mostra un acantosi epidermica e papillomatosi estese, aree acantolitiche e un infiltrato di neutrofili ed eosinofili.

Il pemfigo paraneoplastico, oltre all’acantolisi, presenta anche un infiltrato lichenoidale a banda a livello del derma.

Tzanck test, test informativo nella diagnosi iniziale di PV:

esame citodiagnostico praticato su lesioni cutanee e mucose di recente insorgenza. Il prelievo si effettua prelevando il materiale dal fondo della lesione (bolla) per apposizione tramite una spatola smussa (scraping gentile), dopodiché viene colorato con il metodo May-Grünwald-Giemsa e successivamente, in microscopia ottica, si evidenziano i cheratinociti acantolitici: infatti singole cellule o gruppi di cellule acantolitiche possono essere recuperate con uno striscio dalle bolle o dalle erosioni.

Le caratteristiche citologiche principali del PV sono le **cellule acantolitiche**, ovvero cheratinociti larghi di forma arrotondata con un nucleo ipertrofico, un alone perinucleare e un abbondante citoplasma basofilo.

Quando l’istologia è positiva si richiede l’addendum, ovvero l’esame di immunofluorescenza diretta con IgG, IgA, IgM contro C3, C4 e fibrinogeno.

Immunofluorescenza

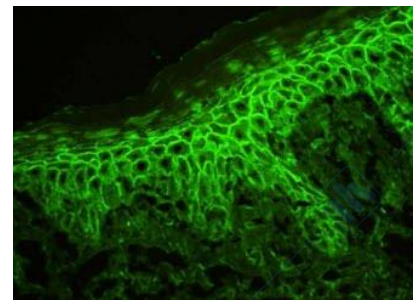
- Diretta (DIF)

L’immunofluorescenza diretta dei campioni bioptici perilesionali è il test diagnostico più accurato e sensibile per tutte le forme di pemfigo.

Il test fatto su campioni bioptici della lesione può produrre falsi negativi, probabilmente dovuti a internalizzazione dei reagenti immunitari da parte dei cheratinociti acantolitici.

Sia nel pemfigo volgare che in quello foliaceo, sono visibili anticorpi IgG e occasionalmente anche la proteina del complemento C3, depositati sulla superficie delle cellule, formando all’interno dell’epitelio una immagine con un pattern a nido d’ape (a rete di pescatore)

Nel pemfigo paraneoplastico si può osservare un deposito addizionale di IgG e C3 lungo la giunzione dermo-epidermica.



- Indiretta (IIF),

Come substrato si usa l'esofago di porcellino d'india o di scimmia oppure pelle umana: su questo tessuto si fa reagire il siero del paziente e se sono presenti IgG, queste si legheranno all'epitelio con un pattern intercellulare. Questo test permette una valutazione semi-quantitativa degli anticorpi IgG contenuti nel siero.

Nel pemfigo paraneoplastico gli autoanticorpi si legano anche alla membrana basale.

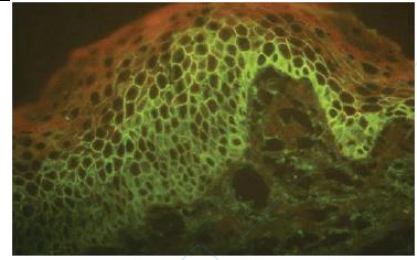


FIGURE 8: Pemphigus. IIF- intercellular, intraepithelial IgG

Test sierologici (ELISA)

La specificità di antigene degli anticorpi circolanti può essere valutata attraverso un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) con autoantigeni (Dsg-1 e Dsg-3) ricombinanti. L'ELISA per le desmogleine ha una sensibilità e specificità per la diagnosi della malattia vicina al 100% - infatti quasi tutti i pazienti hanno anticorpi contro la desmogleina nel siero, ma non sono presenti nei soggetti sani.

I titoli anticorpali spesso correlano con l'attività della malattia e, per questo, sono un ottimo biomarker per il monitoraggio nel follow-up.

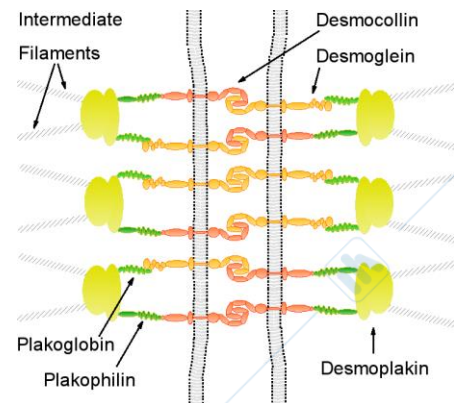
DESMOSOMI

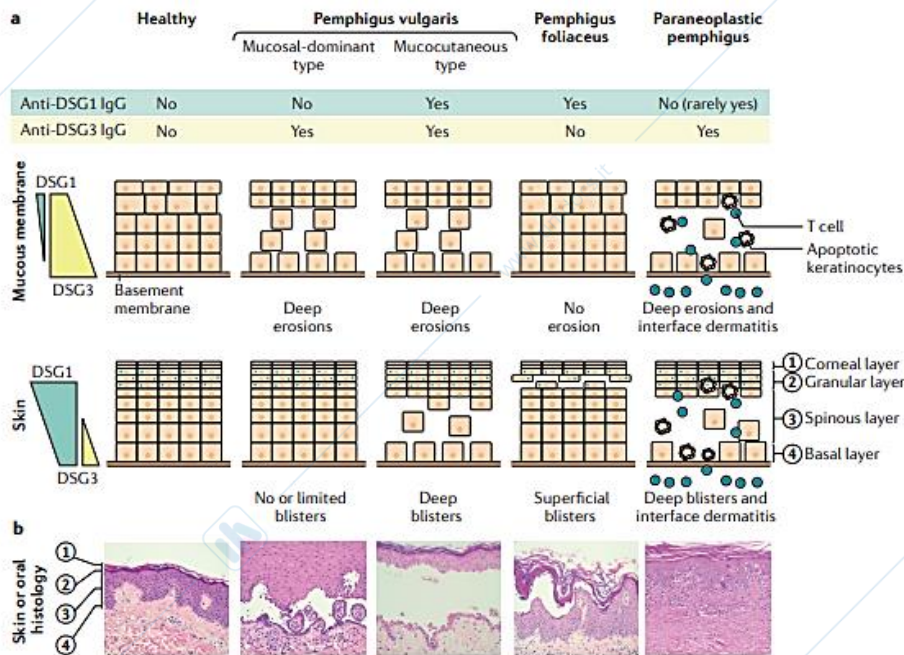
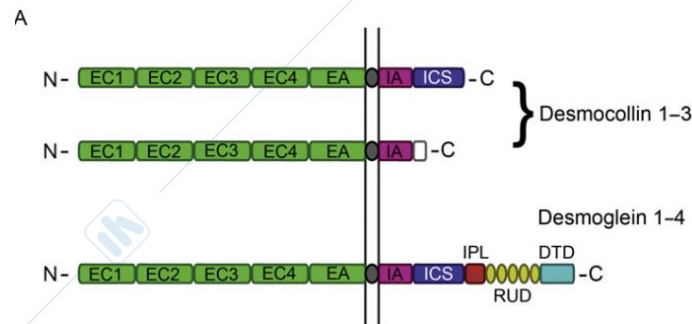
Un desmosoma, o macula adhaerens, è una giunzione di natura proteica tra cellule adiacenti che salda i rispettivi citoscheletri (in particolare i filamenti intermedi, quindi nel caso di un epitelio filamenti di cheratina) donando al tessuto di cui le cellule fanno parte resistenza alla trazione ed altri traumi fisici

Il desmosoma si lega ai filamenti intermedi tramite **una placca citoplasmatica** composta da tre proteine chiamate desmoplachina, plectina e plakoglobin, le quali legano anche le proteine integrali di membrana desmocollina e desmogleina, responsabili del legame a proteine analoghe su di un desmosoma della cellula adiacente.

Nel desmosoma si distingue una componente proteica:

- citoplasmatica, che mediano il legame con i filamenti intermedi, costituita da:
 - desmoplachine, proteine che si legano direttamente ai filamenti intermedi;
 - plakoglobine, proteine che legano direttamente le plakofiline, ma legano anche la desmoplachina
 - plakofiline, legate alla desmoplachina
- trans membrana
- extracellulare, che contiene proteine di adesione della famiglia delle caderine:
 - desmogleine, a loro volta costituite da:
 - Un dominio extracellulare costituito da quattro ripetizioni di domini di caderina (Ig-like) (da EC1 ad EC4) che legano il calcio. I domini EC1 ed EC2 hanno importanti residui per le interazioni che consentono l'adesione - porzione immunogena (IgG₄ contro EC1 e EC2, che si trovano a ridosso della porzione transmembrana)
 - Un dominio trans-membrana
 - Un dominio citoplasmatico, il quale contiene
 - IA - ancora intracellulare
 - ICS - una sequenza caderina-simile intracellulare
 - e sequenze con funzione sconosciuta
 - IPL - una regione ricca di prolina
 - RUDs - un dominio di unità ripetute (Dsg 1-4 si differenziano per il numero di RUDs)
 - Dsg1 → 5
 - Dsg2 → 6
 - Dsg 3 → 2
 - Dsg 4 → 3
 - DTD - un dominio terminale di desmogleina
- desmocolline





I pattern di espressione intraepiteliale della desmogleina-1 e della desmogleina-3 sono diversi nella mucosa orale e nella pelle:

- Nella pelle, la **desmogleina-1** è espressa in tutta l'epidermide, ma è più abbondante negli strati superficiali, mentre la desmogleina-3 è quasi esclusivamente espressa negli strati basali e parabasali
- Nelle membrane mucose, sia la desmogleina-1 che la desmogleina-3 sono espresse in tutto l'epitelio, ma i livelli di desmogleina-1 sono inferiori rispetto a quelli della **desmogleina-3**

Il profilo degli anticorpi contro la desmogleina-1 e la desmogleina-3, espresse con un diverso pattern nella mucosa e nella pelle, corrisponde alle specifiche caratteristiche cliniche delle diverse patologie.

Quindi, la correlazione tra il profilo degli anticorpi e il fenotipo clinico può essere spiegato, fisiologicamente, con la teoria della compensazione delle desmogleine, la quale si basa sulla conclusione che la desmogleina-1 e la desmogleina-3 si compensano quando sono co-espresse nelle stesse cellule e le capacità adesive sono alterate in una di loro.

Nel pemfigo volgare di tipo mucoso gli autoanticorpi IgG contro Dsg-3 provocano erosione della mucosa orale, dove l'isoforma Dsg-3 è quella più abbondante, ma non sono capaci di produrre bolle a livello cutaneo, in quanto c'è la compensazione da parte della Dsg-1.

In maniera simile, gli autoanticorpi IgG contro Dsg-1 nel pemfigo foliaceo provocano bolle superficiali sulla pelle, ma non a livello della mucosa orale.

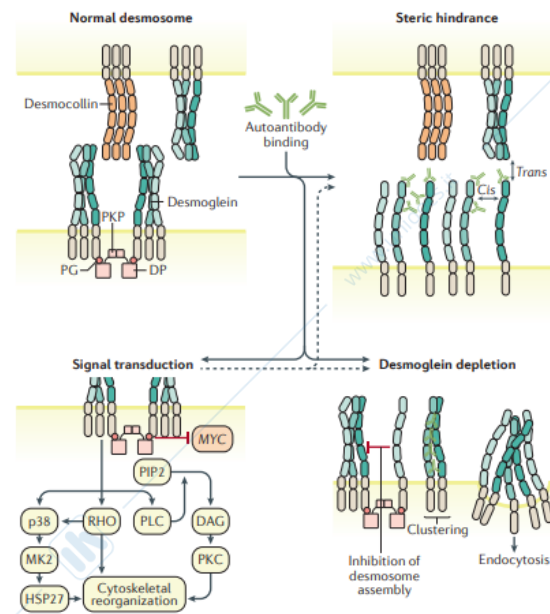
Nella forma di pemfigo muco-cutanea sono presenti entrambi gli autoanticorpi IgG contro Dsg-1 e contro Dsg-3, i quali provocano bolle ed erosioni sia a livello cutaneo che a livello delle membrane mucose.

Nel pemfigo paraneoplastico, in aggiunta alla acantolisi indotta dalla risposta autoimmune umorale, si osserva anche una risposta autoimmune cellulare a livello dell'epidermide, che si traduce nell'apoptosi dei cheratinociti con infiltrazione delle cellule T all'interno l'epidermide - oscurando il confine dell'epidermide e del derma - e una densa infiltrazione banda-like di cellule T nella zona superiore del derma, la quale indica dermatite da interfaccia.

PATOGENESI

L'insorgenza della malattia è dovuta alla perdita di tolleranza immunologica che si caratterizza per la formazione di anticorpi rivolti contro un antigene self quale la desmogleina.

“**Multiple hits**” hypothesis: il legame tra l'anticorpo e la desmogleina rappresenta il **first-hit**, fase di durata variabile in cui il paziente non manifesta la malattia, ma si presentano solo piccole, brevi e ripetute manifestazioni orali che vanno in contro a guarigione. Il passo fondamentale è il **second-hit**, caratterizzata dal manifestarsi della patologia e la cui patogenesi è spiegata da diverse ipotesi (steric hindrance, non assembly depletion hypothesis, signaling theory, basal cell shrinkage hypothesis)



Formazione delle bolle:

La formazione delle bolle, a differenza di altre malattie autoimmuni della pelle, non richiede l'attivazione del complemento, e la presenza di frammenti di anticorpo monovalente sono sufficienti per la formazione delle bolle. A supporto di questa teoria, gli autoanticorpi predominanti sono di sottoclasse IgG₄, i quali non attivano il complemento, attivano scarsamente le cellule effettrici immuni (attraverso la regione Fc) e non cross-linkano efficacemente l'antigene.

Quindi, il legame dell'autoanticorpo può direttamente compromettere la funzione dei desmosomi.

Il processo di deplezione delle Dsg che porta all'acantolisi può essere diviso in due step:

1. I desmosomi perdono le loro capacità adesive e diventano più suscettibili ai successivi processi di delezione – questo è dovuto principalmente all'**interferenza diretta** degli anticorpi sulle interazioni trans della Dsg
2. Eventi di **trasduzione del segnale** portano all'**endocitosi** e alla deplezione della Dsg, provocando la perdita dell'integrità desmosomiale e dell'adesione.

In particolare, gli autoanticorpi che legano la desmogleina possono provocare l'acantolisi epiteliale attraverso diversi meccanismi sinergici.

Molti studi supportano un particolare modello in cui sono presenti più meccanismi che contribuiscono alla acantolisi:

- **STERIC HINDRANCE** (diretta interferenza degli anticorpi con le estremità ammino-terminali delle desmogleine): **ostacolo sterico della adesione desmosomiale mediato dagli autoanticorpi**
Nel pemfigo si producono spesso autoanticorpi rivolti contro i domini extracellulari EC1 ed EC2 delle desmogleine. Gli autoanticorpi patologici rivolti contro la desmogleina-3 legano direttamente i residui dei domini EC1 ed EC2 che mediano l'adesione in cis- (adesione tra molecole sulla stessa cellula) ed in trans- (adesione tra molecole su cellule in opposizione).
NB: le interazioni in trans e in cis possono essere omofiliche, cioè tra due desmogleine, oppure eterofiliche se sussistono tra desmogleine e desmocolline.
- **DESMOGLEIN NON ASSEMBLY DEPLETION THEORY** che determina **interferenza con l'assemblaggio dei desmosomi**: gli autoanticorpi prodotti nel pemfigo possono inibire l'assemblaggio e promuovere il disassemblaggio dei desmosomi, infatti è stato dimostrato che

Nei pazienti con PV è stato osservato nel siero un aumento delle citochine prodotte da i linfociti Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), mentre risultano sopresse le citochine dei Th1 (IL-2 e IFN γ).

Le cellule T CD4⁺ producono principalmente:

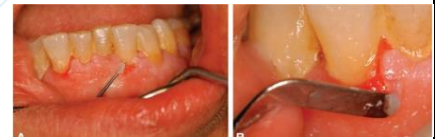
- IL-10, un mediatore chiave nel meccanismo di tolleranza periferica che *in vitro* sopprime l'attività dei linfociti Th2 patogeni specifici per Dsg
- IFN γ , che ha la capacità potenziale di sopprimere i linfociti Th2 patogeni specifici per Dsg

Tuttavia, l'IL-10 ha effetti complessi, infatti è anche capace di promuovere lo switching isotipico delle immunoglobuline verso la formazione di IgG₄ (la sottoclasse predominante degli anticorpi anti-desmogleina)

I linfociti Th2 (CD4⁺) producono IL-4, citochina presumibilmente responsabile della stimolazione dei linfociti B a produrre anticorpi anti-Dsg.

Segno di Nikolsky,

segno clinico che viene eseguito con uno strumento dentale (spatolina da cemento, punta di specillo) determinando una pressione tangenziale orizzontale sulla mucosa e/o sulla pelle. Si deprime lo strumento saldamente sulla mucosa orale e si friziona (pressione + movimento) in maniera delicata per evitare il sanguinamento:



metodo marginale: il bordo dell'area affetta

metodo diretto: la mucosa gengivale apparentemente non affetta ben lontana dalla lesione

Il segno è positivo se si forma una nuova bolla e se lo strato superficiale dell'epitelio si separa facilmente oppure se si estende la lesione preesistente.

È un segno molto sensibile, quindi permette di capire se la lesione è bollosa, ma poco specifico, in quanto potrebbe essere positivo in caso di PV, MMP, lichen bolloso.

Malattia	Istologia	Antigeni bersaglio	IFD	IFI
Pemfigo Volgare	Bolle localizzate in regione soprabasale	Dsg 3, Dsg 1, DSC 1-3 Recettori dell'acetilcolina	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3	Fluorescenza intercellulare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo vegetante	Bolle localizzate in regione soprabasale	Dsg 3, Dsg 1, Dsc 3	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3	Fluorescenza intercellulare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo foliaceo	Bolle localizzate nello strato granuloso	Dsg 1, placoglobina	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3	Fluorescenza intercellulare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo eritematoso	Bolle localizzate nello strato granuloso	Dsg 1	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3; fluorescenza lineare granulare con IgG e C3 lungo la membrana basale	Fluorescenza intercellulare e nucleare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo foliaceo endemico	Bolle localizzate nello strato granuloso	Dsg 1	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3	Fluorescenza intercellulare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo erpetiforme	Vescicole o pustole intraepidermiche, spongiosi eosinofila	Dgl 1(Dgl 3)	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3	Fluorescenza intercellulare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo paraneoplastico	Bolla sia soprabasale che sotto epidermica con necrosi dei cheratinociti	Dsg 3, Dsg 1, Desmoplachina 1, Envoplachina, Periplachina, Plectina, Dsc 1-3, BP 230, A2ML1	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3; fluorescenza lineare con IgG e/o C3 lungo la membrana basale	Fluorescenza intercellulare con IgG su vescica di ratto
Pemfigo farmaco-indotto	Bolle localizzate nello strato granuloso	Dsg 1	Fluorescenza intercellulare con IgG e C3	Fluorescenza intercellulare con IgG su esofago di scimmia
Pemfigo ad IgA	Bolla subcornea con accumuli di eosinofili	Dsg 3, Dsg 1, Dsc 1	Fluorescenza intercellulare con IgA e C3	Fluorescenza intercellulare con IgA su esofago di scimmia

PEMFIGOIDE

Con questo termine ci si riferisce ad un gruppo di malattie rare di tipo bolloso che si presentano a livello cutaneo e mucoso. Queste patologie sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi rivolto contro diversi componenti strutturali della giunzione dermo-epidermica (cioè contro le proteine che legano il citoscheletro dei cheratinociti dello strato basale con la matrice extracellulare del derma)

Questo gruppo comprende 8 patologie principali, in cui sono stati identificati i target molecolari, ovvero gli antigeni contro cui sono rivolti gli autoanticorpi:

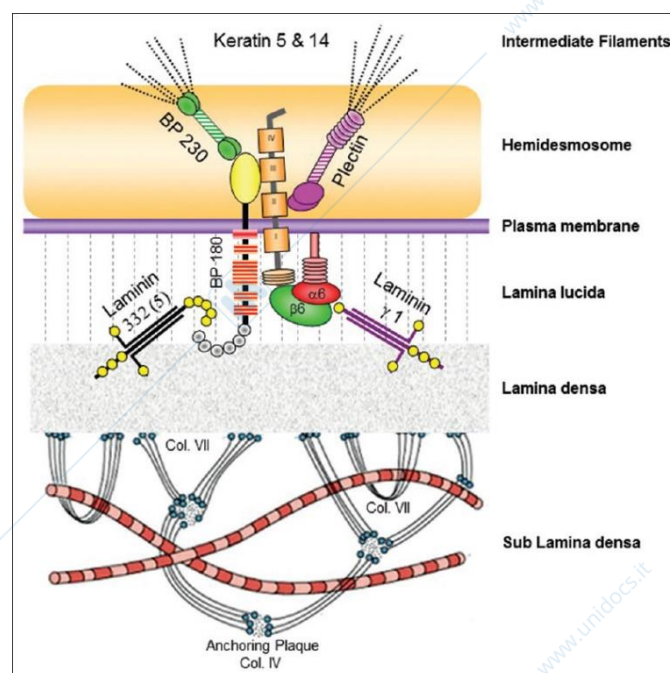
	target molecolare	Segni clinici
Pemfigoide bolloso	Dominio NC16A di BP180 BP230	Bolle tese e erosioni, senza coinvolgimento mucoso predominante
Pemfigoide delle membrane mucose	BP180, laminina-332 BP230, integrina $\alpha 6\beta 4$, laminina-311, collagene VII	Coinvolgimento predominante delle mucose
Pemfigoide gestazionale	Dominio NC16A di BP180 BP230	Periodo della gravidanza o post-parto
Malattia da IgA lineari	LAD-1 BP230 (anticorpi IgA)	Bolle tese e erosioni, senza coinvolgimento mucoso predominante
Epidermolisi bollosa acquisita	Collagene VII	Con variante meccanollosa e infiammatoria
Pemfigoide anti-laminina $\gamma 1$ (anti-p200)	laminina $\gamma 1$ (proteina p200 che si trova nella porzione bassa della lamina lucida)	Bolle tese e erosioni, senza coinvolgimento mucoso predominante
Lichen planus pemfigoide	Dominio NC16A di BP180	Bolle tese che non crescono direttamente sulle lesioni del lichen planus

Queste patologie condividono alcune caratteristiche cliniche come: bolle tese, erosioni.

In realtà, oggi sono state riconosciute solo tre grandi famiglie di pemfigo, con varianti atipiche:

- Pemfigoide bolloso
- Pemfigoide delle membrane mucose
- Pemfigoide gestazionale

Lo stabile legame delle cellule dello strato basale alla membrana basale è funzionalmente importante per il mantenimento dell'integrità dell'epitelio.



STRUTTURA DELLA MEMBRANA BASALE

La membrana basale è un sottile strato di tessuto connettivo che separa un epitelio da un tessuto connettivo: in particolare, separa lo strato di cellule basali dell'epitelio dalla lamina propria sottostante.



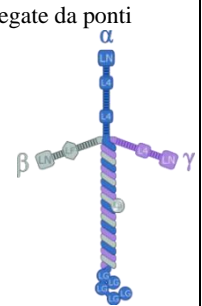
La membrana basale osservata al microscopio elettronico a trasmissione risulta formata da:

- Lamina basale sintetizzata dalle cellule epiteliali, costituita da:
 - **lamina lucida** (o lamina rara), con uno spessore medio di 50 nm – **area BP** occupata principalmente da glicoproteine extracellulari di adesione. Contiene
 - laminina - famiglia di glicoproteine che consistono di tre diverse catene polipeptidiche legate da ponti disolfuro.
 - integrine
 - distroglicano
 - nidogenina o entactina

la laminina lega da un lato recettori integrinici transmembrana e distroglicani, entrambi sporgenti sul versante basale delle cellule epiteliali, e dall'altro i proteoglicani, i glicosamminoglicani e il collagene di tipo IV della lamina densa - tale legame è mediato da un'altra glicoproteina di adesione, l'entactina o nidogenina

- **lamina densa**, il cui spessore varia dai 30 ai 300 nm – **area laminine** è formata da proteoglicani, GAGs liberi (per esempio, eparansolfato) e soprattutto da collagene di tipo IV che non forma fibre ma una sottile e resistente rete
- lamina fibroreticolare (o lamina reticularis) sintetizzata dai fibroblasti costituita da fibre reticolari di collagene di tipo III, non contiene proteoglicani;

Il legame tra la lamina basale e quella reticolare è mediato da fibrille di collagene di tipo VII che legano il collagene di tipo IV della lamina densa. A questo legame concorrono anche i gruppi basici delle fibre collagene, che formano legami con i gruppi acidi dei GAG della lamina densa e la fibrillina.



Le laminine sono glicoproteine della matrice extracellulare e i maggiori costituenti della membrana basale. Hanno la struttura di eterotrimeri a forma di T composti da 3 diverse catene proteiche α , β e γ .

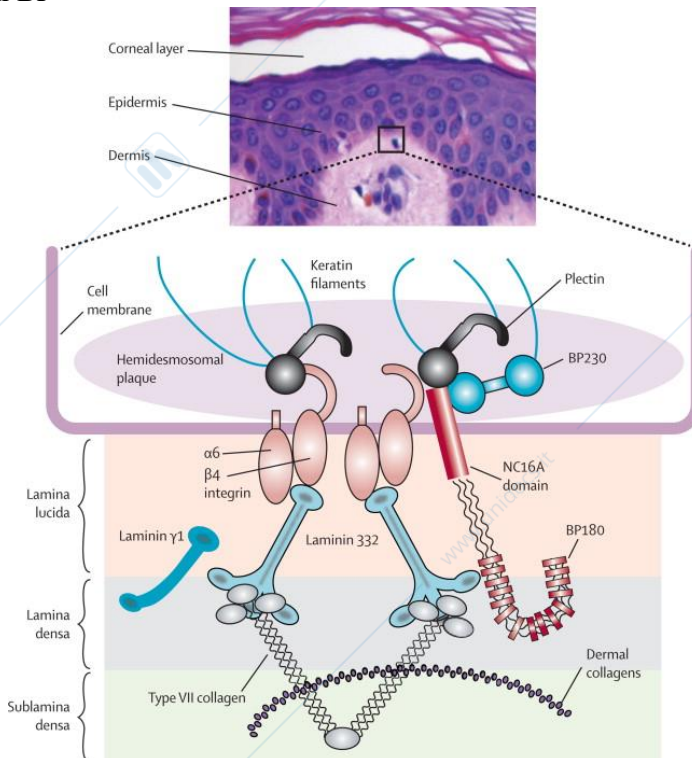
STRUTTURA DEGLI EMIDESMOSOMI

Gli emidesmosomi sono strutture altamente specializzate che permettono la ferma adesione dei cheratinociti dell'epitelio alla matrice extracellulare, attraverso la formazione di una connessione tra la membrana basale sottostante e il network di filamenti intermedi di cheratina presente nelle cellule dello strato basale.

Sono complessi multiproteici e possono essere classificati in due tipi in base ai loro costituenti proteici:

1. **gli emidesmosomi di tipo 1** si trovano nell'epitelio stratificato e pseudo-stratificato e hanno cinque elementi principali:
 - l'integrina $\alpha 6 \beta 4$, **proteina transmembrana** che funziona come un recettore della laminina-332. È un eterodimero obbligato contenente
 - una subunità $\alpha 6$, il cui dominio extracellulare si lega a BP180, CD151 e laminina-322
 - una subunità più grande $\beta 4$, che possiede domini extracellulari che si legano alla fibronectina III e al calcio e domini intracellulari, i quali legano BP230 e P1a e che quindi permettono il legame con i filamenti intermedi di cheratina del citoscheletro
 - la plectina nella sua isoforma 1a (P1a), proteina intracellulare che lega i filamenti intermedi di cheratina ed ha un dominio di legame per la proteina BP180
 - proteina tetraspanina CD151, **intracellulare**
 - BPAG1 o antigene del pemfigoide bolloso di tipo 1 (noto anche come BP230 o distonina), è una **proteina intracellulare** di 230kDa che appartiene alla famiglia delle plachine. Possiede domini che legano all'integrina $\alpha 6 \beta 4$, BPAG2 e la cheratina 5 e 14.
 - BPAG2 o antigene del pemfigoide bolloso di tipo 2 (noto anche come BP180 o collagene di tipo 17), **glicoproteina transmembrana** di 180kDa di circa 1500 aminoacidi che a livello ultrastrutturale attraversa la lamina lucida, si piega a formare un arco nella lamina densa e ritorna nuovamente nella lamina lucida. Ha dei domini intra-citoplasmatici che si legano alla plectina, alla subunità $\beta 4$ dell'integrina e extra-citoplasmatici che legano la subunità $\alpha 6$ dell'integrina e la laminina-332
2. **gli emidesmosomi di tipo 2** si trovano negli epitelii semplici e contengono:

- integrina $\alpha\beta 4$
 - plectina
- senza i due antigeni BP



PEMFIGOIDE BOLLOSO

Epidemiologia: l'incidenza è aumentata di circa 2-5 volte negli ultimi 10 anni, probabilmente per un aumento dell'età media della popolazione e per una miglior sensibilità e specificità diagnostica.

Colpisce principalmente persone di età adulta (insorgenza a 70 anni), ma sono stati riportati pochissimi casi di insorgenza negli adolescenti e nei bambini.

La mortalità ad 1 anno va dal 20 al 40%, a causa dell'età avanzata, dell'uso di alte dosi di corticosteroidi per il controllo della malattia e per la sua diffusione in più distretti del corpo.

Malattie associate: è stata dimostrata una associazione tra il pemfigoide bolloso e i disordini neurologici.

Circa la metà (dal 30 al 56%) dei pazienti con pemfigoide bolloso presenta una patologia neurologica (in particolare: disturbo cognitivo maggiore-demenza, Parkinson, ictus, epilessia e sclerosi multipla). Questo dato probabilmente si correla al fatto che entrambi i target del pemfigoide bolloso, BP180 e BP230, sono espressi nel sistema nervoso centrale. (BP180 è stato principalmente osservato nei granuli di invecchiamento di lipofuscina).

Questa associazione può essere spiegata in virtù della risposta immune cross-reattiva tra gli antigeni della pelle e gli antigeni del SNC.

C'è una evidenza che suggerisce che **BP180** è espresso in alcune porzioni del sistema nervoso centrale, come corteccia, ippocampo, amigdala, retina, cervelletto e bulbo olfattivo: esiste una associazione con malattie neurologiche/psichiatriche come morbo di Parkinson, demenza, epilessia, ictus, SM, depressione, schizofrenia, disturbo bipolare, discinesie sistemiche o orali)

Il gene delle distonina, che codifica per l'isoforma epiteliale del **BPAG1(e)**, è responsabile della codifica dell'isoforma neuronale del BPAG1(a) – quest'ultima ha NC16A sul versante intracellulare.

Per questo motivo è necessario richiedere RM e consulenza neurologica

Altre associazioni comprendono di patologie correlate al pemfigoide bolloso sono

- psoriasi (probabilmente perché l'uso PUVA rappresenta un fattore di rischio)
- neoplasie, in particolare il cancro gastrico e neoplasie ematologiche

Fattori di rischio: sono stati associati diversi trigger all'insorgenza di questa malattia. Tra questi i più accreditati sono il trauma, le ustioni, la radioterapia, la radiazione ultravioletta e il vaccino (specie quello influenzale).

Clinica: si presenta con bolle tese e perlopiù chiare, e con eritema, frequentemente in associazione con placche urticarioidi. In quasi tutti i pazienti è presente prurito. Prima dello sviluppo delle bolle, però, il paziente presenta per diverse settimane una fase prodromica, in cui può esserci solo prurito oppure può essere accompagnato da lesioni escoriate, eczematose e papulari.

Nel 10-20% dei casi si possono presentare lesioni orali lievi, mentre le altre mucose sono raramente affette.

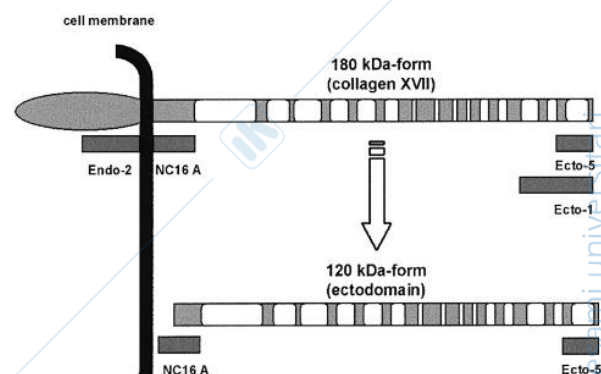
Antigeni target: sono state identificate due proteine emidesmosomiali

- BP180, chiamata anche collagene XVII o BPAG2

La porzione extracellulare del sedicesimo dominio non-collagene, **NC16A**, è la regione contro cui più frequentemente si formano gli autoanticorpi IgG. Molti pazienti, però, sviluppano autoanticorpi anche contro epitopi esterni a questo dominio (**LAD-1** o

ectodominio è la forma solubile di 120kDa, contro cui si formano sia IgA che IgG ed è l'antigene responsabile della malattia da accumulo di IgA; **estremità COOH terminale**, che associato a NC16A determina la forma più frequente di MMP). In questo caso ci può essere un **epitope spreading intramolecolare**

- **BP230**, chiamata anche distonina o BPAG1



PEMFIGOIDE DELLE MEMBRANE MUCOSE

Il primo consensus group sul pemfigoide delle membrane mucose ha definito la malattia:

un gruppo di malattie presunte autoimmuni, caratterizzate da infiammazione cronica e dalla formazione di bolle subepiteliali, che colpisce prevalentemente le membrane mucose, le quali sono caratterizzate da un deposito lineare, lungo la zona della membrana basale epiteliale, di IgG, IgA o della frazione C3 del complemento

Prima si utilizzava il termine **pemfigoide cicatriziale** come sinonimo. Oggi il pemfigoide cicatriziale viene usato per indicare solo la variante clinica rara in cui non sono affette le membrane mucose in maniera predominante e le lesioni sulla pelle guariscono con cicatrizzazione.

Il professore Mignogna li usa, invece, come sinonimi.

Epidemiologia: è una malattia rara

L'incidenza stimata è di 2 casi per 1 milione di persone ogni anno, mentre la prevalenza è di 25 su 1 milione di abitanti.

L'età media di insorgenza va dai 60 ai 70 anni e non c'è predilezione di sesso.

È stata riportata un'associazione con l'allele HLA-DQB*0301

Non si conosce la reale incidenza della forma OMMP (con principale coinvolgimento orale), ma è rara nei bambini-adolescenti e si presenta più frequentemente negli adulti di media età con una predilezione per il sesso femminile.

Clinica:

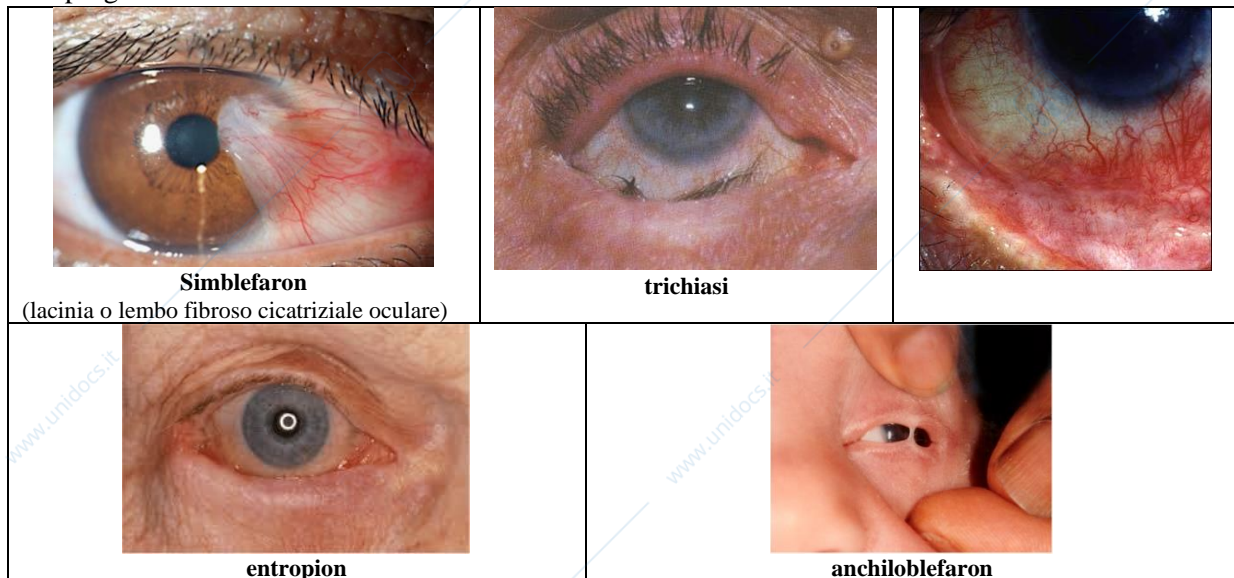
Il pemfigoide delle membrane mucose è una patologia a forte impronta fibrotica ad andamento cronico e progressivo, con una severità variabile, che colpisce:

Cavo orale	85%
Congiuntiva	65%
Pelle	25-30%
Cavità nasale	20-40%
Area anogenitale	20%
Faringe	20%
Laringe	10%
Esofago	5-15%

La malattia può essere confinata solo a livello della congiuntiva nel 20% dei casi e in questo caso si può parlare di **pemfigoide oculare**. Il coinvolgimento della vista è presente nel 50% dei casi. Le lesioni oculari generalmente iniziano unilateralmente con sintomi subdoli, come bruciore, secchezza e sensazione di corpo estraneo e possono avanzare con la formazione di **cicatrici** che causano **simblefaron, trichiasi,**

neovascolarizzazione, entropion, anchiloblefaron e, alla fine, **cecità** (le lesioni oculari non sono visibili, ma l'acuità visiva rimane normale per molto tempo prima della cecità)

La perdita della vista è tipica del 53% dei soggetti. Nei pazienti senza iniziale coinvolgimento oculare, il rischio di sviluppare lesioni oculari è del 5%. Generalmente, se c'è coinvolgimento oculare la malattia tende ad una progressione.



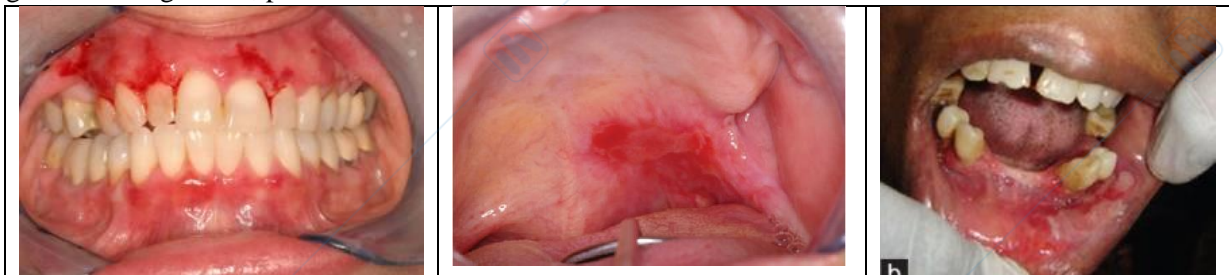
Circa il 90% dei pazienti affetti da pemfigoide delle membrane mucose (MMP) presenta **all'esordio** lesioni orali, in particolare: ulcere a livello del palato e della gengiva, in particolare quella alveolare (sedi atipiche rispetto alle più frequenti afte della mucosa geniena). Se le **lesioni gengivali** progrediscono possono determinare il quadro clinico della "gengivite desquamativa", residuando in cicatrici bianche lucenti. Molto spesso questo quadro clinico viene confuso con quello di una gengivite aspecifica - preambolo di una malattia parodontale cronica.

I pazienti spesso si presentano all'osservazione del clinico lamentando sanguinamento, dolore, disfagia e "peeling-scollamento-sbucciamento" della mucosa. Il paziente, inoltre, ha generalmente una scarsa igiene orale e soffre di alitosi. La mucosa orale all'ispezione si può presentare con aree bianche di **slough** (insieme di tessuto morto derivante dalla ferita e generalmente è considerate come residuo del processo di guarigione. Questa sostanza può presentarsi sottoforma di depositi giallastri, grigi o marroni) necrotico ai margini della zona eritematosa.

Le bolle e le vesciche, a causa dei traumatismi frequenti nel cavo orale, tendono rapidamente alla rottura, infatti sono raramente osservate a livello orale. La rottura della bolla determina la formazione di pseudomembrane che ricoprono le erosioni con forma irregolare, con uno slough giallastro circondato da un alone infiammatorio.



Tutti le regioni della cavità orale possono essere coinvolte: anche palato (duro e molle), faringe, labbra lingua, mucosa geniena, pavimento della bocca.



In tutti i siti del corpo affetti dalle lesioni tendono a guarire con cicatrizzazione (è una malattia a forte impronta fibrotica), ma le lesioni orali hanno la capacità di guarire senza cicatrizzazione

Diagnosi: essendo una malattia cronica e progressiva con sequele irreversibili e spesso debilitanti, la diagnosi precoce è di fondamentale importanza.

Generalmente si eseguono due biopsie:

- Una sul margine della bolla, che viene poi processata in formalina – mostra un distacco subepiteliale con infiltrato infiammatorio
- Una della mucosa o della pelle perilesionale (non-bollosa, ma eritematosa o urticariode) distante circa 1-2 cm da una bolla attiva, che viene poi inserita nel medium di Michel, oppure crioconservata oppure in soluzione salina (se il laboratorio è vicino) per eseguire la immunofluorescenza diretta (DIF)

ci sono 4 raccomandazioni principali per formulare una corretta diagnosi di MMP

Aspetto clinico

Nonostante la cicatrizzazione sia l'hallmark clinico, questa non sempre può essere presente, soprattutto all'esordio orale.

Il paziente nella maggior parte dei casi si presenta all'osservazione del clinico con lesioni orali, spesso a livello di palato molle e gengive: placche eritematose, e molto frequentemente **bolle ed erosioni** (le erosioni possono essere ricoperte da pseudomembrane) che, se presenti a livello gengivale, configurano il quadro della gengivite desquamativa. Spesso queste lesioni si ripresentano nelle stesse zone.

Le lesioni orali sono, in genere, seguite dall'insorgenza delle lesioni a livello oculare, nasale, nasofaringeo, anogenitale, cutaneo, e della mucosa laringea ed esofagea: è associato ad elevata comorbidità, infatti può essere presente cecità (congiuntiva), problemi respiratori fino all'asfissia (laringe), problemi digestivi (esofago)

Il coinvolgimento cutaneo, generalmente, è caratterizzato da poche vescicole o bolle tese che si presentano a livello della testa, del tronco superiore e del collo.

L'evoluzione della patologia è molto rapida, infatti è necessaria una tempestiva diagnosi precoce

Il segno di Nikolsky è, generalmente, positivo

Immunofluorescenza

- Diretta (DIF)

È una tecnica usata per ricercare il deposito di immunoglobuline, complemento e fibrina, usando come substrato un campione biotico della mucosa probabilmente affetta. Si testa il campione per la presenza di IgG, IgA, IgM e C3.

Nel MMP l'immunofluorescenza diretta mostra una deposizione lineare di IgG (ma anche IgA) e/o complemento lungo la zona della membrana basale (subepiteliale) della mucosa perilesionale.

Rappresenta il gold standard per la diagnosi, ma nel 10% dei casi risulta negativa – probabilmente per errori nel campionamento.

Un metodo più sensibile è il direct immunoelectron microscopy, ma non è molto diffuso nei laboratori (richiede la conservazione in glutaraldeide) perché costoso e indaginoso, ma permette di visualizzare i depositi degli anticorpi distinguendo quelli nella lamina lucida da quelli nella lamina densa.

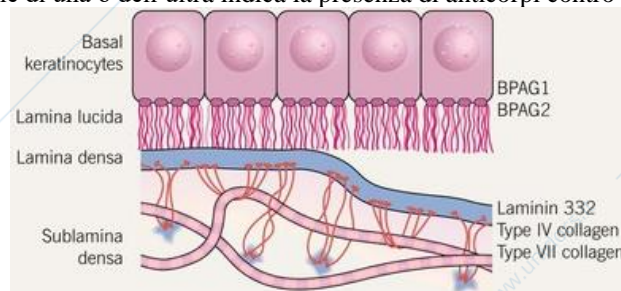
- Indiretta (IIF)

Valuta in vivo gli anticorpi circolanti attraverso la reazione con tessuti murini o di scimmia: il siero del paziente viene fatto reagire con questi tessuti al fine di poter individuare la presenza di anticorpi contro le strutture del tessuto.

Una variante dell'immunofluorescenza indiretta al microscopio è la tecnica che prevede l'uso di pelle umana distaccata attraverso sale (**salt-split skin**: si immerge il tessuto in 1mol/l di NaCl): permette di separare la lamina lucida superiormente (epidermal site) e la lamina densa inferiormente (dermal site).

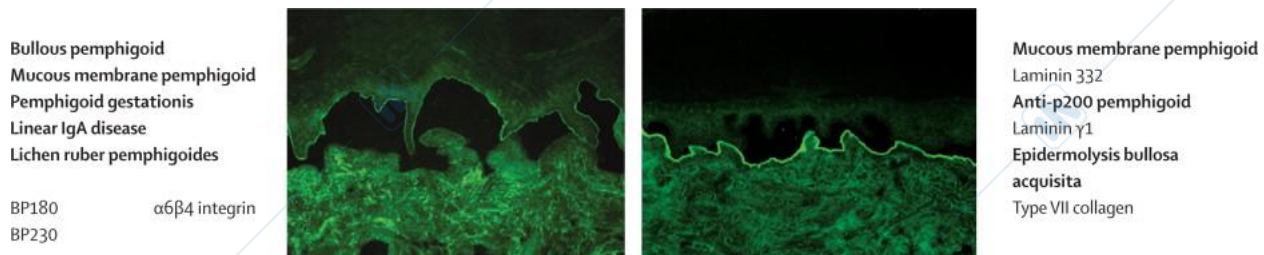
La pelle del soggetto normale viene immersa in 5 ml di una soluzione 1M di NaCl a 4°C per 24 ore.

Dopo 24 h la soluzione induce in una pelle normale un distacco sottoepidermico a livello della lamina lucida – quindi vengono separate lamina lucida e lamina densa (per questo motivo si parla di area BP e di area laminine – la colorazione di una o dell'altra indica la presenza di anticorpi contro quelle proteine)



Il campione (siero del paziente) viene fatto reagire con il tessuto:

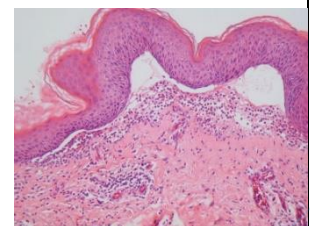
- Gli anticorpi contenuti nel siero diretti contro BP180, BP230 e integrina $\alpha 6\beta 4$ si legano lungo il margine superiore dello split creato artificialmente da NaCl
- Gli anticorpi contenuti nel siero diretti contro la laminina-332, la laminina $\gamma 1$ /antigene p200 e collagene di tipo VII si legano lungo il margine inferiore dello split creato da NaCl.



L'analisi della reattività contro la laminina-332 è di fondamentale importanza in quando è stata dimostrata una associazione con neoplasie solide e MMP. Inoltre, più l'antigene è profondo maggiore è la tendenza di cicatrizzazione della malattia (più grave)

Istopatologia

È necessaria una biopsia: ottenere un campione biotico della gengiva che sia diagnostico del pemfigoide delle membrane mucose è tecnicamente complicato. L'istopatologia mostra uno split-distacco subepiteliale: c'è una separazione giunzionale a livello della membrana basale. Non si osserva acantolisi e necrosi del tetto della bolla. La bolla contiene fibrina ed elementi cellulari (neutrofili ed eosinofili) Al microscopio si osserva anche un **infiltrato infiammatorio** nella lamina propria caratterizzato dalla presenza di **eosinofili**, linfociti, plasmacellule, neutrofili. Nelle fasi tardive di cicatrizzazione si osservano anche proliferazione dei fibroblasti e siti di fibrosi lamellare.



Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Per la ricerca di anticorpi nel siero. In commercio esistono solo sistemi ELISA per la ricerca di anticorpi contro NC16A di BP180 e contro BP230.

Il coinvolgimento gengivale non è patognomonico del pemfigoide, infatti è necessario porre altre malattie autoimmuni in diagnosi differenziale.

Eziopatogenesi:

Il pemfigoide delle membrane mucose è stato caratterizzato a livello molecolare: antigeni target della membrana basale riportati in corso di MMP

- BPAG2 o BP180	75% dei pazienti Nel 50% dei casi gli anticorpi sono rivolti contro NC16A
- BPAG1 o BP230	25%, generalmente associato a reattività contro BP180
- Subunità $\alpha 6$ dell'integrina $\alpha 6\beta 4$	Principalmente, nei pazienti con lesioni orali
- Subunità $\beta 4$ dell'integrina $\alpha 6\beta 4$	Principalmente, nei pazienti con lesioni oculari
- Laminina-5 o laminina-332 (epiligrinaa)	25% - generalmente è colpita la subunità $\alpha 3$
- Collagene di tipo VII	
- Laminina-6	
- Antigene mucoso di 168 kDa	

La conoscenza del tipo di antigene interessato è di fondamentale importanza per il follow-up del paziente. È stato, infatti, osservato che i pazienti con anticorpi anti-laminina 332 presentano un tumore solido nel 30% dei casi (interfaccia immunologica che svolge un ruolo nella progressione tumorale): un paziente con sideropenia e anemia deve essere sottoposto all'esame di sangue occulto nelle feci per sospetto di cancro

PATOGENESI

Il meccanismo immunopatologico è rappresentato da una perdita di tolleranza che si presenta nella forma di una **reazione di ipersensibilità di tipo II**, in cui l'interazione antigene-anticorpo-complemento si svolge a livello della membrana basale dell'epitelio.

I principali autoanticorpi coinvolti nella patogenesi del pemfigoide bolloso sono di tipo IgG, ma nel 60% dei casi sono presenti anche le IgA. La compresenza di queste due immunoglobuline correla con la severità della malattia.

perdita della tolleranza immunologica

formazione di autoanticorpi che legano la membrana basale

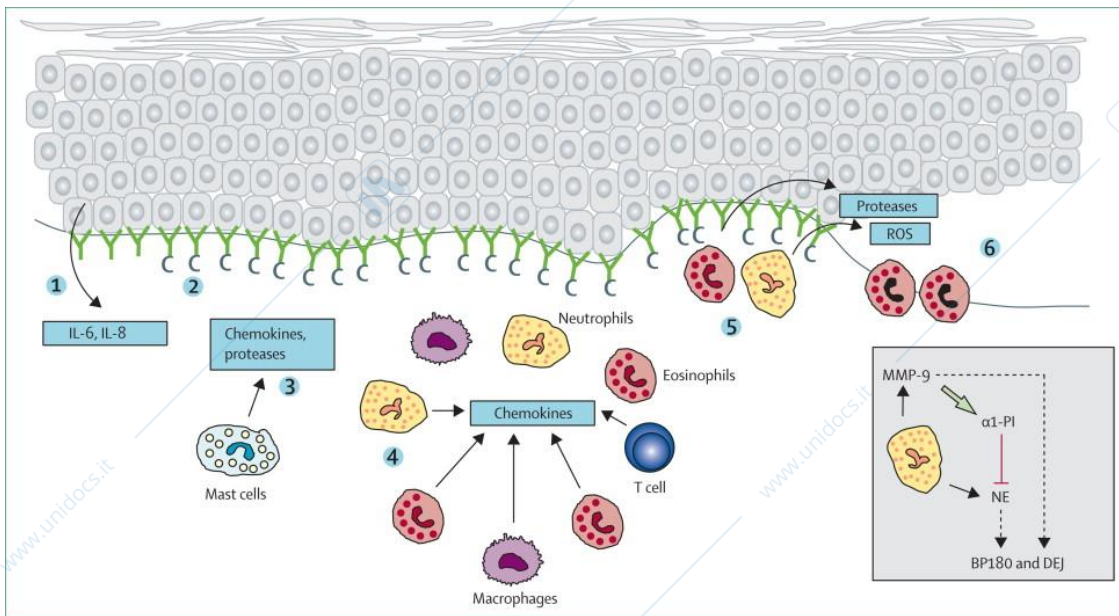
stimolazione dei processi di infiammazione, responsabili della perdita di adesione

L'ipotetica sequenza di eventi che portano alla formazione delle bolle prevede:

1. il legame degli autoanticorpi con il BP180 inizia gli eventi, indipendenti dal recettore Fc, che portano al rilascio da parte dei cheratinociti basali di IL-6 e IL-8
2. viene attivato il complemento a livello della giunzione dermo-epidermica
3. i mastociti degranulano a livello della giunzione dermo-epidermica
4. infiltrazione nello strato superiore del derma di cellule dell'infiammazione, dovuta all'attivazione del complemento e ai gradienti di chemochine
5. Prima del rilascio di proteasi e di ROS da parte dei granulociti a livello della giunzione dermo-epidermica, la reazione infiammatoria viene amplificata dalla secrezione di mediatori dell'infiammazione
6. Le metalloproteinasi (MMP-9) secrete dai neutrofilii tagliano $\alpha 1$ -PI (inibitore delle proteinasi $\alpha 1$) per rimuovere l'inibizione dell'elastasi dei neutrofilii (NE): sia MMP-9 che NE degradano le proteine della giunzione dermo-epidermica, compresa BP180

Quindi, la formazione del distacco dermo-epidermico sembra essere dovuto all'attivazione di meccanismi infiammatori.

Gli anticorpi contro la laminina-332, però, sembrano essere caratterizzati da un meccanismo patogenetico di formazione delle bolle di tipo non-infiammatorio, quindi non c'è coinvolgimento del complemento e l'attivazione dei mastociti, ma non si conosce l'esatto meccanismo con cui si formano le bolle.



PEMFIGOIDE GESTAZIONALE, o herpes gestationis

È una forma peculiare di pemfigoide associato alla gravidanza, che si presenta in 1 paziente su 1700-50000 gravidanze.

Generalmente, si presenta nel secondo o nel terzo trimestre di gravidanza, ma nel 10% dei casi colpisce le donne 4 settimane dopo il parto.

Le pazienti presentano papule e placche eritematose e pruriginose, cambiamenti simil-eritema multiforme, lesioni eczematose, oppure vescicole e papule che nascono intorno all'ombelico e si diffondono sull'addome e alle cosce.

Le bolle franche non sono sempre presenti.

L'andamento clinico è benigno: le lesioni scompaiono dopo 4-6 settimane. In meno del 5% delle pazienti la malattia persiste e si trasforma in pemfigoide bolloso.

MALATTIA DA IgA LINEARI

Viene chiamata così per le sue caratteristiche immunopatologiche, cioè per il legame lineare delle IgA alla giunzione dermo-epidermica. Presenta delle caratteristiche in comune con il pemfigoide bolloso e con il pemfigoide delle membrane mucose.

EPIDERMOLISI BOLLOSA ACQUISITA

È una patologia clinicamente eterogenea caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi contro il **collagene VII**. Clinicamente si possono distinguere due forme:

- Classica, con bolle tese e fragilità della pelle localizzate a livello delle superfici che vanno in contro ad estensione e sono sottoposte a trauma
- Infiammatoria, che assomiglia al pemfigoide bolloso e al pemfigoide delle membrane mucose

In entrambi i sottotipi, le membrane mucose sono coinvolte nella metà dei pazienti.

PEMFIGOIDE ANTI-LAMININA γ 1 (ANTI-p200)

È una forma di pemfigoide rara, con meno di 100 casi riportati.

Clinicamente assomiglia al pemfigoide bolloso, ma l'epidemiologia cambia: infatti, colpisce pazienti più giovani e in circa un terzo dei casi questi presentano una psoriasi concomitante.

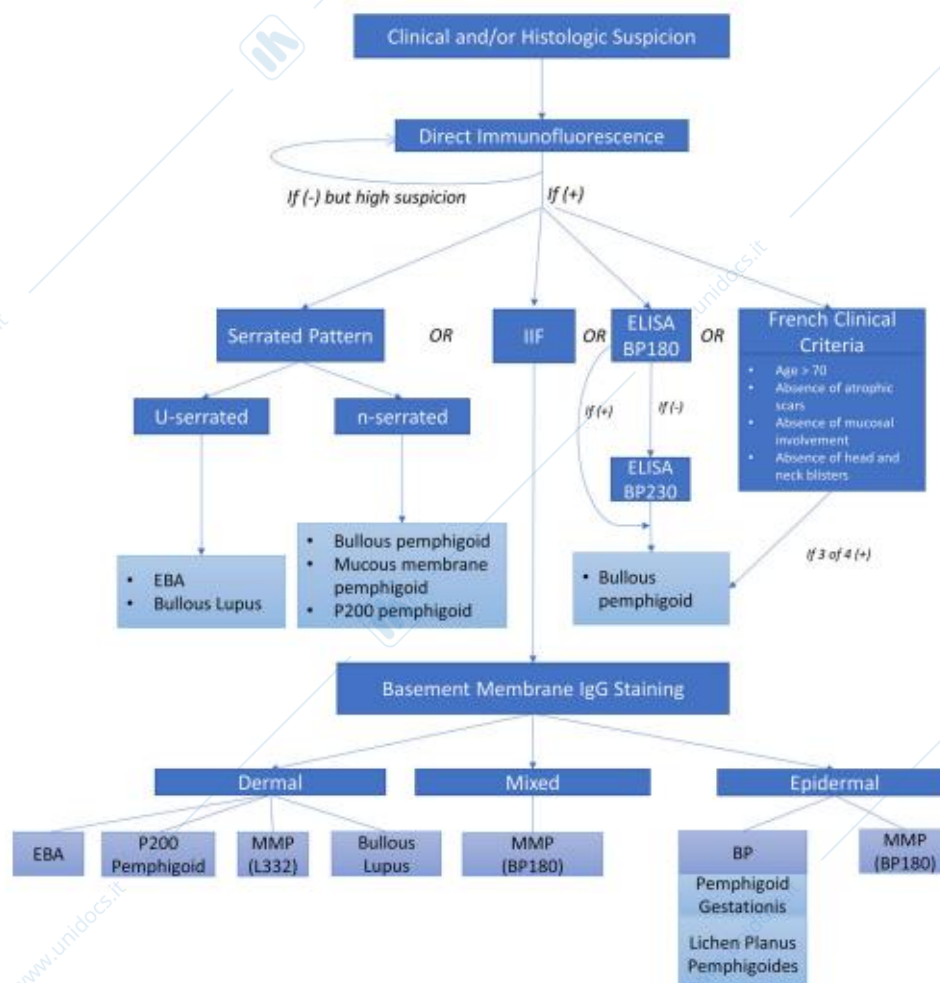
LICHEN PLANUS PEMFIGOIDE o LICHEN PLANUS BOLLOSO

È una forma di pemfigoide rara, con meno di 100 casi riportati.

Si presenta sempre in associazione al lichen planus (figurazioni sulle mucose e sulle gengive)

La patogenesi sembra essere legata ad una risposta particolarmente violenta dei linfociti T citotossici che determinano la formazione di una bolla subepiteliale che può andare in contro a cicatrizzazione, con distacco dell'epitelio a livello della lamina basale.

Il principale target antigenico è BP180 e colpisce prevalentemente i pazienti giovani (con una età media di insorgenza di 40-50 anni). La diagnosi differenziale con MMP e PV si fa con la DIF che non è positiva per IgG ma per fibrinogeno, ovvero un prodotto di degradazione cellulare dopo apoptosi delle cellule dello strato basale


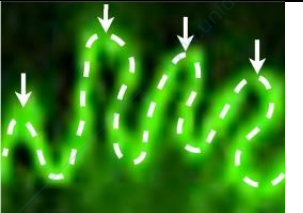

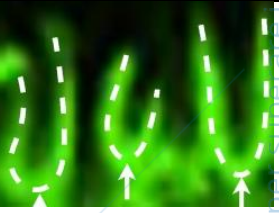


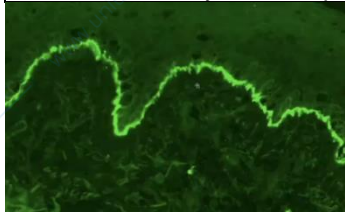
DIAGNOSI DIFFERENZIALE delle malattie bollose del cavo orale

È necessario effettuare una diagnosi precoce e corretta attraverso:

- Anamnesi, cercando di indagare la condizione di salute sistemica del paziente e l'eventuale interessamento di altri distretti (congiuntiva, raucedine soprattutto per il pemfigoide)
- Esame clinico, con ispezione della sede delle lesioni e, in genere, accompagnato dall'esecuzione del segno di Nikolsky in una zona della probabile bolla dove si vede una netta demarcazione del tetto). In alcuni casi potrebbe essere utile valutare lo spessore del tetto e il contenuto della bolla (quando è giallastro probabilmente contiene fibrinogeno quindi spinge verso il pemfigoide o il lichen bolloso)
- Biopsia con istologia
- ELISA per antigeni BPAG1, BPAG2, DSG-1, DSG-3 (gli unici a Napoli)
- Immunofluorescenza diretta e indiretta

Nel lichen l'immunofluorescenza è positiva per fibrinogeno e negativa per le IgG. La dermatite erpetiforme è una manifestazione orale della celiachia che si manifesta con aspetto erpetiforme a livello del palato duro e del palato molle ed è caratterizzata da accumulo non lineare di IgA focale/granulare sotto le papille

DIF BMZ (basement membrane zone)				
IIF-salt split	Epidermal site	Dermal site	Dermal site	
sAIBD (subepidermal autoimmune blistering diseases)	BP MMP CP LAD	p200 (γ1) anti-LN-332	EBA bSLE	
BP: bullous pemphigoid MMP: mucous membrane pemphigoid, CP: cicatricial pemphigoid LAD: linear IgA dermatosis p200: anti-p200 pemphigoid anti-LN-332: antilaminin-332 MMP EBA: epidermolysis bullosa acquisita bSLE: bullous systemic lupus erythematosus				



Questa immagine rappresenta una IIF dopo salt split: l'immunofluorescenza è nel dermal site, quindi si potrebbe trattare anche di EBA, ma osservando il serration pattern a **n**, non si può trattare di EBA. Per distinguere facilmente i due tipi di pattern basta pensare che n-serrated ha le punte che vanno verso il basso, mentre u-serrated ha le punte che vanno verso l'alto (come fili d'erba)

BIOPSIA

La biopsia è un atto fondamentale per la diagnosi delle malattie bollose, fornendo informazioni sulla morfologia della lesione: sul livello di separazione tissutale (cleft intraepiteliale sovrabasale o subepiteliale), sulla presenza/assenza di una reazione cellulo-mediata subepiteliale, perché la presenza di un infiltrato, soprattutto linfocitario CD8/CD4, è indicativa di lichen planus (reazione linfocitaria lichenoidale); nel pemfigoide si potrebbe evidenziare anche una eosinofilia.



Inoltre, la biopsia viene usata per le indagini di immunofluorescenza diretta, che permette di capire la localizzazione (intercellulare, in membrana basale) e la composizione (fibrinogeno, IgG, IgA, IgM, C3 e C4) della reazione immunologica

Tecnica bioptica

In presenza di lesione cutanea, la biopsia si effettua sulla cute; nelle zone in cui la bolla si è rotta non c'è più contatto nell'epitelio e potrebbe esserci tessuto reattivo, eventualmente infetto: la biopsia dovrebbe comprendere una bolla intera, cercando di non romperla, oppure essere perilesionale. La cute perilesionale, però, può diventare lesionale a seguito di una qualsiasi manipolazione (anche con il bisturi), perché l'epitelio scorre sul cleft e si accartocchia.

Quasi tutti usano il punch e poco la lama di bisturi convenzionale, ma il punch prevede di essere ruotato durante il prelievo, quindi è impensabile usarlo sul cavo orale.

In generale, la biopsia sulla cute è meno complicata rispetto alla biopsia sulle mucose, che ha come complicazione principale la perdita del tetto della bolla.

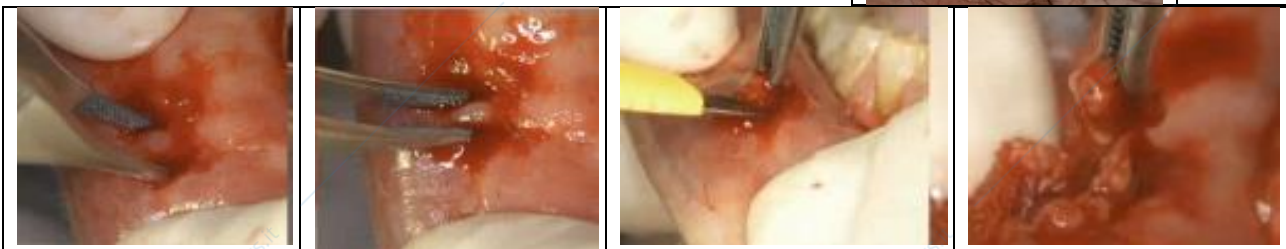
La biopsia a livello della mucosa del cavo orale deve essere fatta, dopo opportuno inquadramento diagnostico di malattia bollosa, in **sede perilesionale** oppure si preleva parte dell'area ma con ampia zona perilesionale, poiché è poco utile prelevare la zona di lesione.

La sequenza della tecnica di biopsia per le lesioni bollose:

1. Se possibile, l'anestesia dovrebbe essere fatta a distanza
2. Si eseguono due incisioni parallele distanti 4 mm profondi circa 3 mm (l'epitelio è spesso 1 mm), senza strisciare la lama del bisturi sulla mucosa altrimenti si accartocchia l'epitelio, ma si poggia la lama e si scende in profondità con un taglio netto verticale
3. Con un Adson chirurgico (pinza con dentini) inserito nelle sue incisioni si stringe e si blocca il tessuto – la parte centrale non si deve muovere (zona ischemizzata nella foto 2)
4. Si solleva leggermente il pezzo e si taglia la base, completando la separazione.

Bisogna fare molta attenzione a sezionare bene gli angoli, perché se si lascia un angolo del tetto legato quando si trazione il tessuto per tirarlo via si rompe – è consigliato sovrapporre le incisioni degli angoli, incidendo in eccesso

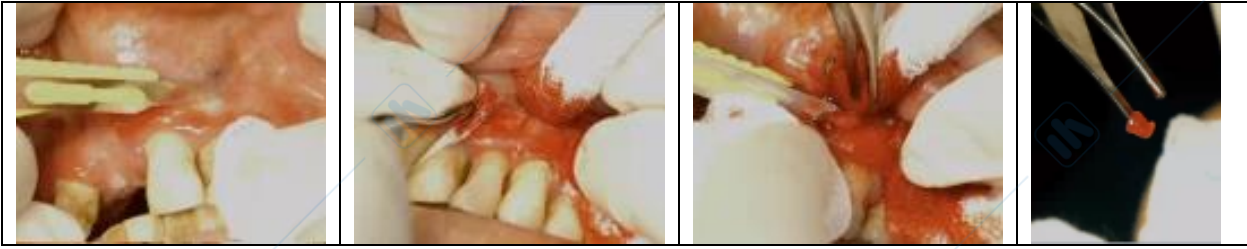
5. Si controlla che ci sia il tetto; se non c'è si deve eseguire nuovamente la biopsia, finché il tetto non è contenuto.
6. Per questi pezzi bioptici si sceglie ancora la formalina come elemento fissatore perché, se deve essere sottoposto a immunofluorescenza, è necessario che non venga schiacciato o compresso con il sottovuoto. In assenza di formalina, si potrebbe poggiare il pezzo bioptico con il corion sull'abbassalingua (rigido, ma senza spuntoni), metterlo in una bustina e metterlo nel sottovuoto. In realtà oggi, tutti i tessuti bioptici vengono imbustati e messi sottovuoto (l'uso della formalina è stato vietato nelle strutture ospedaliere) e poi inviati in tempi rapidi in patologia per la processazione.



Sulla gengiva è più facile grazie alla presenza del piano osseo: si schiaccia il bisturi sul piano osseo sottostante, evitando sempre di strisciarlo. In questo caso non si inserisce l'Adson chirurgico, poiché non ci

entra, ma si stacca per via tagliente il pezzo dal letto periosteo sottostante. (molto spesso la gengiva è infiammata, quindi non sempre è possibile effettuare in questa zona la biopsia)

In questi prelievi bioptici non si usa l'aspiratore che potrebbe aspirare il tetto, ma una graza che assorbe sangue per capillarità.

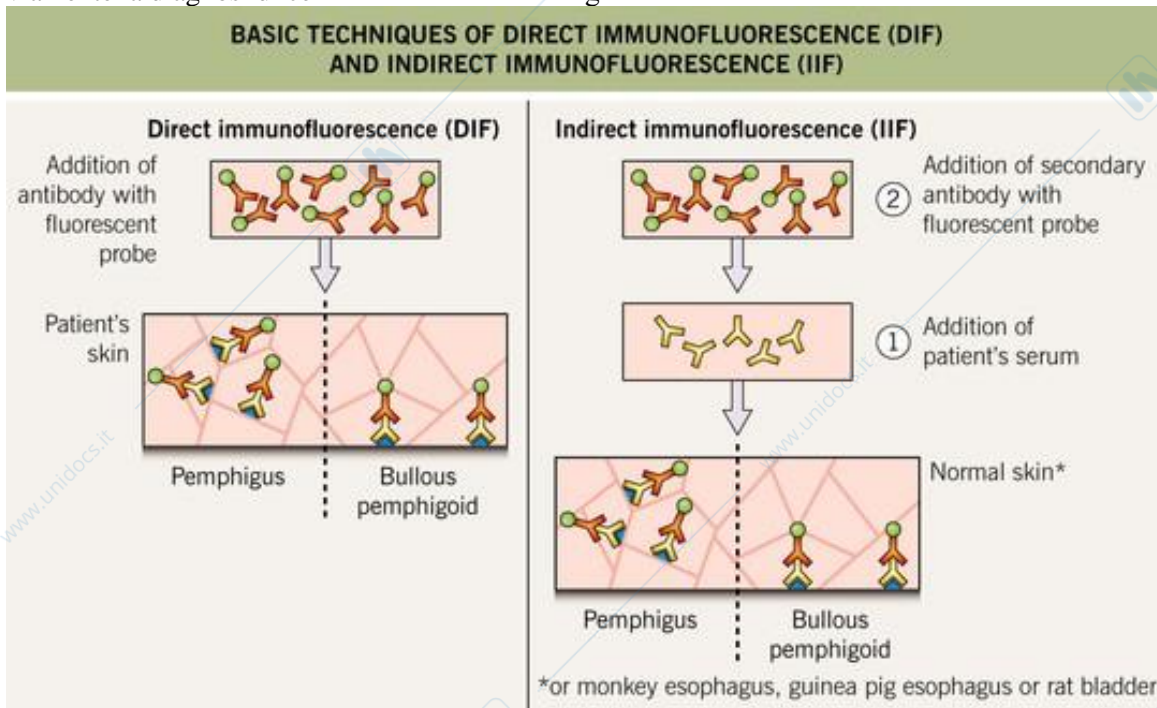


Diagnosi differenziale tra pemfigo e pemfigoide

A livello clinico, nello stadio iniziale possono essere molto simili: si presentano bolle a livello gengivale molto simili, ma differiscono per la progressione, infatti il pemfigoide resta confinato al palato molle, alle gengive e ai pilastri, colpendo meno le altre sedi; mentre, il pemfigo si estende a tutte le mucose del cavo orale. Inoltre, il pemfigo è caratterizzato da un maggiore interessamento della mucosa del setto, mentre nel pemfigoide si osserva eritema della congiuntiva e sinblefaron dopo eversione della palpebra (o altri segni di fibrosi).

Il pemfigoide delle membrane mucose raramente si estende alla cute con piccole bolle sporadiche (se lo fa in maniera massiva è un pemfigoide bolloso e raramente interessa il cavo orale).

Ovviamente la diagnosi di certezza si ha con l'istologia e l'immunofluorescenza.



TERAPIA:

Questa terapia può uccidere il paziente nel 5% dei casi, quindi deve essere poggata su due pilastri fondamentali, ovvero la diagnosi certa e l'inquadramento sistemico del paziente.