

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Prof. Roberto Vettor

CLINICA DERMATOLOGICA

Direttore: Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

TESI DI LAUREA

GENOTIPIZZAZIONE DI HLA-CW6 IN PAZIENTI AFFETTI DA PEMFIGO

RELATORE: Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

CORRELATORE: Dott. Alvise Sernicola

LAUREANDA: Sarah Girotto

Anno Accademico 2022-2023

INDICE

ABSTRACT	1
SINOSI	3
INTRODUZIONE	5
1. MALATTIE BOLLOSE AUTOIMMUNI.....	5
2. MECCANISMI COESIONE CUTANEA.....	6
2.1 COESIONE INTERCHERATINOCITARIA.....	6
2.2 COESIONE DERMO-EPIDERMICA.....	10
3. MALATTIE BOLLOSE DEL GRUPPO DEL PEMFIGO.....	11
3.1 PEMFIGO PARANEOPLASTICO.....	12
3.2 PEMFIGO ERPETIFORME.....	13
3.3 PEMFIGO IgA.....	13
3.4 PEMFIGO VOLGARE E FOLIACEO.....	14
EPIDEMIOLOGIA	
FISIOPATOLOGIA	
CLINICA	
DIAGNOSI	
TRATTAMENTO	
4. MALATTIE BOLLOSE DEL GRUPPO DEL PEMFIGOIDE.....	35
4.1 PEMFIGOIDE GESTAZIONALE.....	36
4.2 PEMFIGOIDE DELLE MEMBRANE MUCOSE.....	36
4.3 DERMATOSI IGA LINEARI.....	37
4.4 EPIDERMOLISI BOLLOSA ACQUISITA.....	37
4.5 DERMATITE ERPETIFORME DI DUHRING	37
4.6. PEMFIGOIDE BOLLOSO.....	38
EPIDEMIOLOGIA	
FISIOPATOLOGIA	
CLINICA	

DIAGNOSI

TRATTAMENTO

4. HLA-CW6 E AUTOIMMUNITÀ.....	49
SCOPO DELLO STUDIO.....	52
MATERIALI E METODI	53
1. DISEGNO E POPOLAZIONE OGGETTO DI STUDIO.....	53
2. TECNICHE DI LABORATORIO.....	55
3. ANALISI STATISTICA.....	59
RISULTATI.....	61
DISCUSSIONE.....	64
CONCLUSIONI.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	72

ABSTRACT

Background: Pemphigus is an organ-specific autoimmune bullous disease involving skin and mucous membranes, caused by the production of autoantibodies directed against desmosomal proteins. In particular, pemphigus vulgaris and foliaceus represent the two most common variants and they are respectively characterized by the development of autoimmunity in the former case, directed against desmoglein 1 and in certain cases also combined with desmoglein 3. Antibody binding is followed by interepidermal cleavage. Clinically we notice the formation of blisters and/or vesicles that may localize to different sites, depending on the tissue-specific expression of desmoglein isoforms. Diagnosis is based on histopathological examination, direct and indirect immunofluorescence and confirmatory serologic testing. The importance of HLA-CW6 has been extensively investigated in multiple literature studies, which have demonstrated its finding to be associated with a major susceptibility to the development of early onset and severe course psoriasis. Although not much is known about its role in autoimmune bullous diseases and pemphigus in particular, as of today's date.

Aim of the study: The aim of the present study is to evaluate the association between the presence of the HLA-CW6 gene polymorphism and the susceptibility to the development of pemphigus, by comparing the observed frequency with the prevalence of the polymorphism in a healthy population drawn from the literature.

Materials and methods: A sample of 40 patients with pemphigus was recruited. Molecular biology studies were performed to assess the HLA alleles of these patients from whole blood samples based on multiparametric analysis using EUROArray.

Results: Among the 40 cases of pemphigus patients, EUROarray showed an HLA-CW6 gene frequency of 7.5 %.

Conclusions: Our results showed an HLA-CW6 allele frequency of 7.5 % in the examined sample of pemphigus patients, which did not show a statistically significant difference from the prevalence reported in the literature for an Italian population. It is hoped that this study may provide a basis for conducting analyses of larger samples of subjects to compare with a homogeneous control group of healthy subjects from the same geographical area, as well as a potential association of other HLA alleles with pemphigus.

SINOSI

Background: Il pemfigo è una patologia bollosa autoimmune organo-specifica che coinvolge pelle e mucose, causata dalla produzione di autoanticorpi diretti contro le proteine desmosomiali. In particolare pemfigo volgare e foliaceo rappresentano le due varianti più comuni e rispettivamente sono caratterizzate dallo sviluppo nel primo caso, di autoimmunità diretta contro la desmogleina 1 in alcuni casi combinata con la desmogleina 3. Al legame anticorpale consegue il clivaggio intraepidermico. Clinicamente si ha la formazione di bolle e/o vescicole che possono localizzarsi in differenti siti, a seconda dell'espressione tessuto-specifica delle isoforme di desmogleina. La diagnosi si fonda sull'esame istopatologico, immunofluorescenza diretta e indiretta e test sierologici di conferma. L'importanza di HLA-CW6 è stata ampiamente analizzata in molteplici studi di letteratura che hanno dimostrato come il suo riscontro si associ ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo di psoriasi ad esordio precoce e a decorso severo. Ad oggi invece è poco noto il suo ruolo nell'ambito delle patologie bollose autoimmuni e in particolare del pemfigo.

Scopo dello studio: Lo scopo del presente studio è la valutazione dell'associazione tra la presenza del polimorfismo del gene HLA-CW6 e la suscettibilità allo sviluppo del pemfigo confrontando la frequenza osservata con la prevalenza del polimorfismo in una popolazione sana di riferimento tratta dalla letteratura.

Materiali e metodi: È stato reclutato un campione di 40 pazienti affetti da pemfigo. Per la valutazione degli alleli HLA di tali pazienti sono stati eseguiti studi di biologia molecolare, a partire da campioni di sangue intero, basati su un'analisi multiparametrica tramite EUROArray.

Risultati: Tra i 40 casi di pazienti affetti da pemfigo, EUROarray ha mostrato una frequenza del gene HLA-CW6 pari all'7.5%.

Conclusioni: I nostri risultati hanno evidenziato una frequenza dell'allele HLA-CW6 pari al 7.5% nel campione esaminato di pazienti affetti da

pemfigo, che però non hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa rispetto alla prevalenza riportata in letteratura per una popolazione italiana. Ci si auspica che questo studio possa costituire una base di partenza per l'effettuazione di analisi su campioni più ampi di soggetti da confrontare con un gruppo di controllo omogeneo composto da soggetti sani provenienti dalla stessa area geografica, nonché una potenziale associazione di altri alleli HLA con il pemfigo.

INTRODUZIONE

1. MALATTIE BOLLOSE AUTOIMMUNI

Le malattie bollose autoimmuni rappresentano un gruppo di patologie a genesi autoimmunitaria caratterizzate dalla comparsa di erosioni e/o vesciche sia a livello cutaneo che mucoso. (1)

Si ha la formazione di autoanticorpi circolanti aventi come target i complessi coinvolti nella coesione cutanea, nello specifico essi possono essere rivolti contro le strutture desmosomiali, che garantiscono l'adesione tra cheratinociti adiacenti o quelle emidesmosomiali che invece assicurano l'integrità tra cheratinociti e derma sottostante.

Il legame anticorpale è tale da determinare la perdita di funzione di queste strutture, deficit adesivo e conseguente comparsa dei segni clinici di malattia. (2)

La diagnosi delle patologie bollose si basa in prima istanza sull'obiettività clinica. In particolare la rilevazione di vesciche tese, prurito, soprattutto se si verificano in soggetti di età avanzata sono indicative di pemfigoide bolloso, mentre vesciche flaccide e segno di Nikolsky positivo sono attribuibili in prima istanza ad un quadro sospetto di pemfigo volgare. Fondamentale tuttavia per fare diagnosi definitiva è l'esecuzione di microscopia a immunofluorescenza diretta su criosezioni di biopsie perilesionali, che ha l'obiettivo di rilevare la localizzazione e la tipologia di autoanticorpi legati al tessuto. Nello specifico il pemfigo è caratterizzato dal legame di IgG e/o C3 nell'epidermide/epitelio; nelle malattie da pemfigoide invece IgG e/o C3 si distribuiscono linearmente a livello dermo-epidermico. (fig. 1)

Importante ai fini diagnostici è anche la microscopia ad immunofluorescenza indiretta che dosa gli autoanticorpi circolanti. In questo caso come substrati ad elevata sensibilità diagnostica troviamo nella diagnosi del pemfigo, l'esofago di scimmia o cavia e nella diagnosi di pemfigoide, la sezione dermo-epidermica di cute umana pretrattata con NaCl 1M.

Negli ultimi anni è entrato nella pratica clinica anche l'utilizzo del test ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay che sfrutta proteine ricombinanti che legano autoanticorpi circolanti eventualmente presenti, garantendo una valutazione sia qualitativa che quantitativa. (3)

Malattia	Pelle	Mucosa	Segno Nikolskij*	DIF**	IIF	Autoantigene
Pemfigoide bolloso	+	-	II	BMZ	BMZ	BP180
Pemfigo volgare	+/-	+	IO	CWP	CWP	Dsg3 +/- Dsg1
Pemfigo foliaceo	+	-	IO	CWP	CWP	Dsg1

*Il segno Nikolsky I è il classico segno Nikolsky; il segno Nikolsky II alternativo era originariamente descritto come il segno Asboe-Hansen.

**BMZ: zona della membrana basale; BP: pemfigoide bolloso; CWP: modello a filo di pollo; DIF: immunofluorescenza diretta; Dsg: desmoglein; IIF: immunofluorescenza indiretta.

Figura 1 – Caratteristiche cliniche e di laboratorio delle dermatopie bollose.

Tratto da: Damoiseaux J. Bullous Skin Diseases: Classical Types of Autoimmune Diseases. Scientifica [Internet]. 2013 [citato 20 aprile 2023];2013:457982. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820359/>

Sulla base dei criteri clinici, istopatologici e immunopatologici le dermatopie bollose autoimmuni possono essere distinte fondamentalmente in due entità: le forme vescicolari subepidermiche tra cui rientra il pemfigo e la cui patogenesi è imputabile alla formazione di autoanticorpi diretti contro le proteine desmosomiali Dsg1 e Dsg3 e le forme vescicolari subepidermiche di cui fa parte il pemfigoide, caratterizzato da autoimmunità con target le proteine degli emidesmosomi BP180 e BP230. (4)

2. MECCANISMI DI COESIONE CUTANEA

La cute rappresenta un'interfaccia multistrato tra organismo e ambiente, la cui integrità è fondamentale per garantire le diverse funzioni fisiologiche della stessa, tra cui il ruolo di barriera. (5)

2.1 Coesione intercheratinocitaria

Nel contesto degli epiteli, l'adesione intercheratinocitaria è garantita dalle giunzioni cellula-cellula specializzate, che possono essere distinte in:

- Giunzioni gap (GJ)
- Giunzioni strette (TJ)
- Giunzioni aderenti (AJ)

- Desmosomi (6)

Queste strutture sono accumulate dalla presenza sia di molecole di adesione che permettono il contatto con le cellule adiacenti, sia di proteine citoplasmatiche che organizzano i complessi di segnalazione e forniscono un collegamento meccanico al citoscheletro di actina (o ai filamenti intermedi nel contesto dei desmosomi). Le proteine strutturali del citoplasma possono anche costituire dei collegamenti temporanei tra più complessi proteici, la cui composizione è variabile in rapporto alla maturazione ed integrità giunzionale, determinando la costituzione di entità sovramolecolari dinamiche. (7)

Giunzioni gap (GJ)

Le giunzioni gap sono complessi giunzionali composti da connessioni a loro volta formati dall'oligomerizzazione di sei connesine eterotipiche o omotipiche. A livello cutaneo le connesine presenti sono CX26, CX43, CX30, CX30.3, CX31 (noti anche come GJB2 GJA1 GJB6 GJB4 GJB3). I connessioni vanno poi ad unirsi in maniera omotipica o eterotipica con il corrispettivo partner sulla cellula adiacente, al fine di costituire un canale pervio che consenta il trasporto intercellulare di ioni e altre piccole molecole. (8)

Giunzioni strette (TJ)

Le giunzioni strette costituiscono una struttura con morfologia a cintura localizzata a livello del versante apicale delle cellule granulari.

Queste tipologie di giunzioni possiedono due funzioni. La prima è quella di fungere da barriera sotto lo strato corneo per prevenire la diffusione intramembrana di lipidi e proteine, caratteristica fondamentale affinché sia mantenuta una distribuzione asimmetrica nella composizione di membrana tra porzione apicale e basolaterale (polarità) (9); La seconda è quella di esercitare funzione di regolatrici della permeabilità paracellulare per ioni e piccoli soluti, proprietà sostanzialmente organo-specifica e variabile a seconda dell'epitelio in base alle necessità dell'organo stesso. (10)

Differentemente dalle AJ e dai desmosomi, le giunzioni strette strutturalmente non si basano su caderina, ma bensì su claudina e occludina che rappresentano i componenti transmembrana predominanti. La claudina è un costituente fondamentale per l'assemblaggio delle TJ, differentemente dall'occludina che nonostante non sia necessaria direttamente alla formazione dei filamenti a giunzione stretta, riveste comunque un ruolo importante nel loro funzionamento. (11)

Sul versante citoplasmatico si trovano le molecole di collegamento intercellulari ovvero i tre membri della famiglia MAGUK, Zonula occludens (ZO) -1, -2 e -3 che mettono in comunicazione le TJ con il citoscheletro di actina. Queste proteine ZO possono interagire tra loro e legare diverse proteine tight e AJ così come F-actina. (12)

Giunzioni aderenti (AJ)

Le giunzioni aderenti sono costituite da caderine classiche che connettono le cellule adiacenti tramite interazioni omofile calcio dipendenti. Le caderine si connettono al citoscheletro tramite l'interposizione delle catenine, proteine che si associano alla coda citoplasmatica delle prime. Si viene a creare dunque una rete transcellulare di filamenti di actina, con i complessi caderina-catenina che fungono da connettori dei fasci di filamenti di actina nello spazio intercellulare. La caderina è una proteina la cui funzionalità è dipendente dalla quota di calcio disponibile, e in merito a questo è stato visto che l'esaurimento della quota di calcio disponibile si traduce in una perdita di adesione e un'arrotondamento cellulare nonostante l'integrità delle altre molecole che coadiuvano (non calcio-dipendenti). (13)

Desmosomi

I desmosomi dal punto di vista strutturale sono composti da proteine derivate da tre famiglie geniche: caderine, proteine dell'armadillo e plakin.

I membri transmembrana di caderine, desmogleine (Dsgs 1-4) e desmocolline (Dscs 1-3), contribuiscono a formare l'interfaccia adesiva (14), mentre le code delle caderine forniscono la piattaforma di legame

per i membri della famiglia degli armadilli plakoglobin (PG), plakophilins (PKPs 1-3) 1-3 e p007. (15)

Desmoplakin (DP), connessa a PG e PKP, a sua volta collega i filamenti intermedi citoscheletrici alla sua corrispondente regione specializzata di membrana plasmatica. (16) Le interazioni laterali della giunzione ne aumentano la stabilità. (17)

Si vengono quindi a costituire: una a placca densa esterna, prossimale alla membrana cellulare, che corrisponde al sito in cui la plakoglobina e le placofiline legano le code citoplasmatiche della caderina desmosomiale; E una placca densa interna che corrisponde al sito in cui la coda della desmoplachina si lega alle cheratine. (18) (fig. 2)

Oltre al ruolo strutturale i costituenti desmosomiali hanno un ruolo importante anche nel contesto della segnalazione cellulare e di interazione con chinasi e proteasi. (19)

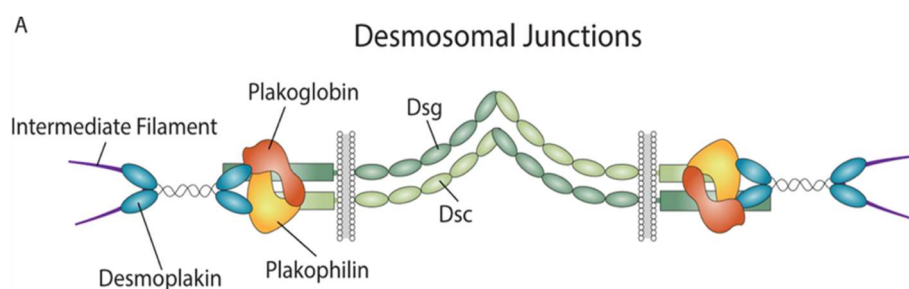


Figura 2 – Il complesso desmosoma-filamento intermedio.

Tratto da: Green KJ, Roth-Carter Q, Niessen CM, Nichols SA. Tracing the Evolutionary Origin of Desmosomes. *Curr Biol.* 2020 May 18;30(10):R535-R543. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.047. PMID: 32428495; PMCID: PMC7310670.

I desmosomi in vivo sono espressioni di una proprietà nota come iperadesione che riflette un'insensibilità al calcio extracellulare. Questo concetto di iperadesività descrive la capacità dei desmosomi di formare dei collegamenti intercellulari nel complesso filamento intermedio-desmosoma. Si ritiene che all'origine di questo meccanismo ci sia la disposizione ordinata dei domini extracellulari delle caderine desmosomiali che è responsabile della forte resistenza di legame alla

rottura e comporta l'intrappolamento del calcio all'interno di uno o più domini di legame extracellulare. Questa iperadesione può essere fortemente ridotta attraverso l'azione della PKC che trasloca nei siti di adesione e tramite i gruppi fosfato perturberà l'impacchettamento dei domini extracellulari che, disordinati, adatteranno il tipo di adesione più debole con legami a bassa affinità e conseguente pronta rimozione del calcio dagli agenti chelanti. In particolare la down-regolazione avviene nell'epitelio del bordo della ferita. (20)

Nello specifico, la PKC α si dissocia gradualmente dalla placca desmosomiale durante l'instaurazione di uno stato indipendente dal calcio, mentre in situazioni di dipendenza dal calcio, è vero il contrario e la PKC α si trasloca nei siti di adesione (21)

2.2 Coesione dermo-epidermica

La giunzione dermoepidermica (DEJ) media l'adesione tra porzione dell'epidermide basale e del derma superiore, costituendo di fatto un'interfaccia tra queste due componenti. Funzionalmente consente lo scambio e il trasporto di nutrienti, oltre che di altre varie molecole tra l'epidermide non perfusa e il derma perfuso.

La DEJ rappresenta una membrana basale altamente specializzata sulla quale giacciono i cheratinociti basali, i quali tramite filamenti intermedi aderiscono agli emidesmosomi.

I cheratinociti poi a loro volta sono connessi alla membrana basale tramite filamenti di ancoraggio che attraversano la lamina lucida superiore e collegano gli emidesmosomi alla lamina densa. Dalla lamina densa le fibrille di ancoraggio si estendono poi al derma e raggiungono il collagene fibrillare dermico. Le interconnessioni nel loro complesso conferiscono l'integrità strutturale e stabilità meccanica al complesso dermo-epidermico. (22)

La giunzione dermo-epidermica morfologicamente appare caratterizzata da papille dermiche sporgenti verso l'alto e papille epidermiche protruse verso il basso che le conferiscono la caratteristica tridimensionalità (23)

Emidesmosomi

Gli emidesmosomi sono complessi giunzionali che mediano l'adesione stabile tra cellule epiteliali basali e membrana basale sottostante.

Essi risultano composti da una placca interna ed esterna oltre che da una placca sottobasale. La prima funge da sito di ancoraggio per i filamenti intermedi ed è composta da proteine emidesmosomiali citoplasmatiche HD1/plectina e BP230. La seconda invece è costituita da integrina $\alpha_6\beta_4$ e BP180. (24) (Fig. 3)

Una volta assemblato, l'emidesmosoma svolge un ruolo essenziale nel mantenere una solida adesione epiteliale alla membrana basale oltre che di sito di trasduzione del segnale mediato da integrina $\alpha_6\beta_4$. (25)

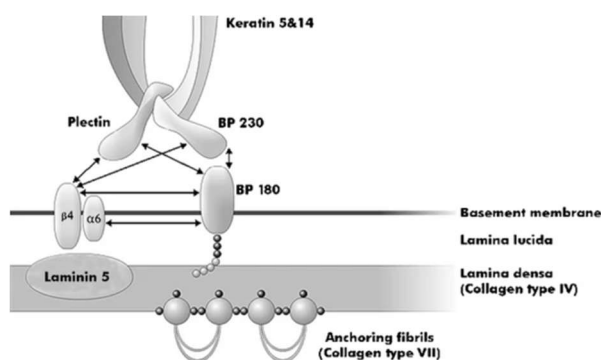


Figura 3 – Rappresentazione schematica del complesso di ancoraggio dermo-epidermico.

Tratto da: Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. Clin Rev Allergy Immunol. 2007 Oct;33(1-2):67-77. doi: 10.1007/s12016-007-0030-y. PMID: 18094948.

3. MALATTIE BOLLOSE DEL GRUPPO DEL PEMFIGO

Le malattie bollose appartenenti al gruppo del pemfigo sono patologie bollose autoimmuni caratterizzate dalla produzione di autoanticorpi rivolti contro le componenti desmosomiali, a cui consegue la formazione di lesioni vescicolari intraepidermiche.

Le forme più frequenti sono rappresentate dal pemfigo volgare e pemfigo foliaceo in cui si ha la formazione di gammaglobuline rivolte rispettivamente contro Dsg1/3 e Dsg1. Altre forme sono rappresentate dal pemfigo paraneoplastico, erpetiforme e pemfigo IgA.

La diagnosi differenziale tra i diversi sottotipi di pemfigo è effettuata in base a criteri clinici, istologici e sulla base degli antigeni target degli autoanticorpi circolanti. (26)

3.1 Pemfigo paraneoplastico

Il pemfigo paraneoplastico è un sottotipo di pemfigo la cui comparsa concomita con una patologia neoplastica che può essere maligna come i linfomi a cellule B o benigna come la malattia di Castelman. Proprio in ragione della dipendenza tra sviluppo della patologia e le neoplasie, è tuttora oggetto di discussione il possibile ruolo patogenetico degli antigeni tumorali nel determinare crossreattività con secondario innesco dell'autoimmunità.

In questo caso le lesioni sono localizzate a livello della mucosa orale con comparsa di stomatite emorragica estesa, dolore intenso e resistenza alla terapia. (27) (fig. 4)

I sintomi/segni clinici possono essere:

- Simil pemfigo con vesciche flaccide e superficiali, erosioni e croste con eritema limitato;
- Pemfigoide bolloso con presenza o assenza di vescicole tese e papule eritematose desquamanti;
- Simil eritema multiforme con lesioni eritematose squamose ed erosioni;
- Graft versus host disease-like con papule squamose rosso scuro disseminate;
- Liken planus like con papule violacee squamose piatte.

Particolarmente grave è il possibile sanguinamento intrapolmonare legato alla deposizione a questo livello di immunoglobuline e complemento e sviluppo di bronchiolite obliterante. Il pemfigo paraneoplastico può determinare anche un coinvolgimento sistemico ed in questo caso si parla di “sindrome multiorgano autoimmune paraneoplastica” (PAMS). (28)

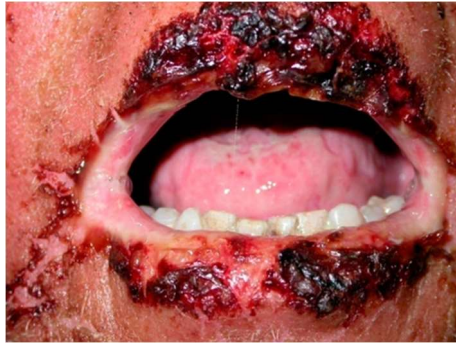


Figura 4 – Lesioni periorali PNP con ulcerazioni con formazione di croste in regione periorale e sulle labbra.

Tratto da: Paolino G, Didona D, Magliulo G, Iannella G, Didona B, Mercuri SR, Moliterni E, Donati M, Ciofalo A, Granata G, Ranuzzi P, Falasca V, Calvieri S. Paraneoplastic Pemphigus: Insight into the Autoimmune Pathogenesis, Clinical Features and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 26;18(12):2532. doi: 10.3390/ijms18122532. PMID: 29186863; PMCID: PMC5751135.

3.2 Pemfigo erpetiforme

Si tratta di una forma di pemfigo caratterizzata clinicamente da vescicole a grappolo e lesioni eritematose intensamente pruriginose. È stata descritta in letteratura la possibile evoluzione di questa variante nelle in PV o PF e viceversa. (29)

3.3 Pemfigo IgA

Il pemfigo IgA può manifestarsi sottoforma di due tipologie distinte: dermatosi pustolosa subcornale (SPD) e dermatosi intraepidermica neutrofilica (IEN). Clinicamente si avrà la presenza di vescicole flaccide o pustole che tendenzialmente si associano, formando un cerchio crostoso al centro con possibile eritema associato. Solitamente le lesioni si localizzano a livello delle pieghe inguinali o ascellari ma anche a livello delle porzioni prossimali degli arti e del tronco. (30)

3.4 Pemfigo volgare e foliaceo

Epidemiologia

Pemfigo volgare

Il tasso di incidenza annuale riportato in letteratura risulta compreso tra lo 0.76 e 16.1 casi per milione di abitanti all'anno, con valore massimo rilevato in Finlandia e minimo in Israele. (31)

Per quanto riguarda l'età di insorgenza risulta variabile tra la III e VII decade di vita, tuttavia è noto come all'interno della popolazione araba ci sia una età di insorgenza più precoce rispetto a quella ebraica. In generale per quanto riguarda la distribuzione per sesso si ha una netta preponderanza femminile.

Il pemfigo volgare è una patologia caratterizzata da una distribuzione a maggiore incidenza in alcuni gruppi etnici specifici, in particolare negli ebrei ashkenaziti e in quelli di origine mediterranea, in ragione di un'elevata frequenza in questi gruppi di alcuni aplotipi HLA che si sono dimostrati essere correlati ad una maggiore predisposizione allo sviluppo della patologia. (32)

La mortalità dei pazienti affetti da pemfigo volgare è andata incontro ad una netta riduzione a seguito dell'introduzione di corticosteroidi ed immunosoppressori nei protocolli terapeutici (33).

Rispetto alla popolazione generale tuttavia è stato riscontrato, in uno studio effettuato su pazienti affetti a Taiwan, un aumento del tasso di mortalità correlata allo sviluppo di polmoniti, sepsi, malattie cardiovascolari e ulcera peptica. (34)

Pemfigo foliaceo

Per quanto riguarda il pemfigo foliaceo, la sua incidenza annuale negli USA e in Europa è stimata in meno di un caso per milione di abitanti all'anno. Il picco di età di insorgenza è rappresentato dalla V decade, senza preferenze di sesso e di etnia. E' nota una forma di pemfigo foliaceo, detta fogo selvagem, endemica nelle aree del Brasile, Colombia e Tunisia. In particolare a seguito del riscontro di elevati livelli di IgG anti-Dsg1 in individui sani residenti in zone endemiche, si è ipotizzato che alla base dello sviluppo della patologia ci potesse essere la genesi di una risposta

autoimmunitaria contro Dsg1, secondaria ad un meccanismo di mimetismo molecolare scatenata dal il morso dell'insetto *Simulium nigrimanum*. (35)
La mortalità correlata alla patologia è nettamente inferiore rispetto a quella associata a pemfigo volgare, avendo il pemfigo foliaceo un'evoluzione più lenta e cronica. Questo è stato infatti dimostrato attraverso studi di letteratura in cui la mortalità dei pazienti affetti è risultata perfettamente sovrapponibile a quella della popolazione generale. (36)

Genetica

È stata comprovata la presenza di una suscettibilità genetica correlata all'antigene leucocitario umano (HLA).

In uno studio condotto su ebrei ashkenaziti affetti da pemfigo volgare, è emerso come più del 92.3% risultavano portatori di HLA-DR4, DQw3, di cui tutti erano del sottotipo DR4, DQw8. Nei portatori di HLA-DR4, DQw8, il 75% portava l'uno o l'altro, se non entrambi, dei due aplotipi (HLA-B38, SC21, DR4) o HLA-B35, SC31, DR4. In particolare il primo si è dimostrato comune tra gli ebrei non ashkenaziti, il secondo negli ashkenaziti. (37)

L'associazione tra HLA di tipo II e pemfigo volgare, è stata documentata anche in un altro studio che ha evidenziato una correlazione con DR4 e DR14, il primo più frequente negli individui di sesso femminile. Più del 95% dei pazienti con pemfigo volgare è risultato portatore di almeno uno dei seguenti alleli DRB1 * 0402 e DQB1 * 0503.

Per quanto riguarda DRB1, si è individuato un aumento altamente significativo di DRB1 * 0402 (prevalente nella popolazione ebraica ashkenazita e spesso associato a DQB1 * 0503), DRB1 * 1401, DRB1 * 1404, e più recentemente DRB1 * 1454.

Relativamente a DQB1 invece si è osservato un incremento significativo del sottotipo DQB1 * 0503 (in collegamento con DRB1 *14) così come una presenza significativa di DQB1 * 0302 (in collegamento con DRB1 * 04). (38)

Fattori scatenanti

- Farmaci

Lo sviluppo del pemfigo volgare si è visto essere indotto dall'assunzione

di diverse categorie di farmaci tra cui quelli contenenti gruppi tiolici (come la penicillamina e il captopril), legami disolfuro (piritinolo) oppure anelli eterociclici contenenti zolfo (piroxicam) questi ultimi che subiscono cambiamenti metabolici tali per cui si ha la conversione in tioli, denominati tioli mascherati o latenti.

Questi agenti sono in grado di provocare il pemfigo volgare attraverso l'incorporazione dei tioli nella struttura molecolare dei cheratinociti, che determina una modifica nella conformazione antigenica delle desmogleine di membrana con conseguente innesco di un attacco autoimmune. Inoltre sono in grado di creare uno squilibrio nelle cellule immunocompetenti amplificando l'autolesionismo acantolitico. (39)

- *Virus*

È stato documentato come l'infezione da Herpesvirus possa avere un ruolo nella comparsa del pemfigo volgare e questo è emerso anche da uno studio condotto su un campione di pazienti affetti da pemfigo, dove la sequenza di DNA del virus Herpes simplex, Epstein-Barr, Herpesvirus umano 6 sono stati rilevati nelle lesioni cutanee nonché nei linfomonociti circolanti. Si pensa che questo sia legato ad una sovraregolazione infiammatoria sia di tipo cellulare sia umorale, che in soggetti predisposti può innescare l'autoimmunità. Un'altra ipotesi è che il danno epiteliale provocato dall'infezione virale, esponga antigeni normalmente protetti con produzione di IgG anti Dsg1 e/o 3. (40)

- *Fattori fisici*

Gli agenti fisici sono stati individuati anch'essi come fattori in grado di scatenare la comparsa di pemfigo in individui predisposti e tra questi gli UV hanno un ruolo rilevante. È stato dimostrato come le radiazioni ultraviolette scatenino una forma transitoria di PV in pazienti sani e allo stesso modo favoriscano il relapse in pazienti già affetti. In particolare la terapia PUVA con psoralene e UVA ha dimostrato come solo la banda UVA funga da eventuale induttore. (41)

Nell'ambito della radioterapia ionizzante oncologica si è osservato come le lesioni bollose tendono a manifestarsi nella zona irradiata e poi

ad espandersi acquisendo nuove localizzazioni. (42)

Comorbidità

Numerosi studi osservazionali hanno messo in evidenza come frequentemente nei pazienti affetti da pemfigo sia presente un'associazione con altre patologie autoimmuni, tra cui malattie autoimmunitarie tiroidee, l'artrite reumatoide oltre che diabete mellito di tipo I, rispetto alla popolazione generale. (43)

Da uno studio caso-controllo di Taiwan è stata riscontrata un'associazione del pemfigo con la sindrome di Sjogren, lupus eritematoso sistemico e alopecia areata (44) Tra le malattie infiammatorie intestinali, solo la colite ulcerosa si è associata al pemfigo. (45)

Molti studi sono stati condotti anche per provare l'associazione tra pemfigo e sviluppo di psoriasi. In una meta-analisi è stata stimata una probabilità aggregata di sviluppo di psoriasi 3.5 volte maggiore nei pazienti con pemfigo, rispetto alla popolazione generale. La prevalenza di psoriasi nel gruppo dei casi emersa è pari a 2.4% in tutti gli studi pubblicati. (46)

La correlazione tra pemfigo e sviluppo di tumori solidi non è stata ancora ben definita, in uno studio trasversale israeliano è emersa un'aumentata incidenza di tumori solidi e in particolare di tumore esofagei e laringei in pazienti affetti da pemfigo rispetto alla popolazione generale. (47)

Per quanto concerne le neoplasie ematologiche è stato rilevata una maggiore associazione nei pazienti con pemfigo di leucemia cronica (anche dopo aggiustamento per la terapia immunosoppressiva mutagena utilizzata nella gestione terapeutica), mieloma multiplo e linfoma non Hodgkin. (48)

Dal punto di vista delle problematiche psichiatriche, la prevalenza del disturbo bipolare è pari ad un 1% rispetto allo 0.5% che si rileva nella popolazione generale. (49) Allo stesso modo la prevalenza del disturbo schizofrenico è risultata pari al 2% nei casi rispetto al 1.3% dei controlli sani. (50)

È stata evidenziata anche una maggiore prevalenza di patologie neurologiche come Parkinson, demenza e epilessia. (51)

Si è riscontrata inoltre una maggiore prevalenza di osteoporosi nei pazienti con pemfigo rispetto alla popolazione generale, tale per cui anche dopo

aggiustamento dei fattori confondenti come età, sesso, terapia con glucocorticosteroidi l'OR risultava pari a 4.27. (52)

Fisiopatologia

Il pemfigo è una patologia autoimmune caratterizzata dalla produzione di autoanticorpi IgG rivolti contro la desmogleina (Dsg1 e/o Dsg3) a cui consegue l'acantolisi intraepidermica.

Gli autoanticorpi anti desmogleina agiscono con diverse modalità nell'induzione della patologia, in particolare essi sono in grado di creare un impedimento sterico all'adesione con modalità di tipo trans o cis, inserendosi rispettivamente tra molecole di desmogleina localizzate su cellule adiacenti o tra molecole site sulla superficie della medesima cellula. Inoltre gli autoanticorpi intervengono sia inibendo l'assemblaggio dei desmosomi sia promuovendone il disassemblaggio tramite raggruppamento e/o endocitosi delle desmogleine. (53)

Infine il legame delle IgG al target, è in grado di alterare la trasduzione del segnale intracellulare attraverso l'induzione della fosforilazione di p38, MK 2 e infine di HSP27, riorganizzazione dei filamenti di actina e secondaria acantolisi. (54) (fig. 5)

A comprova di questo sono stati condotti degli studi su modelli murini in cui l'inibizione della via di segnale intracellulare mediata da p38, nonostante la presenza degli autoanticorpi, non portava alla comparsa dei segni clinici di malattia. (55)

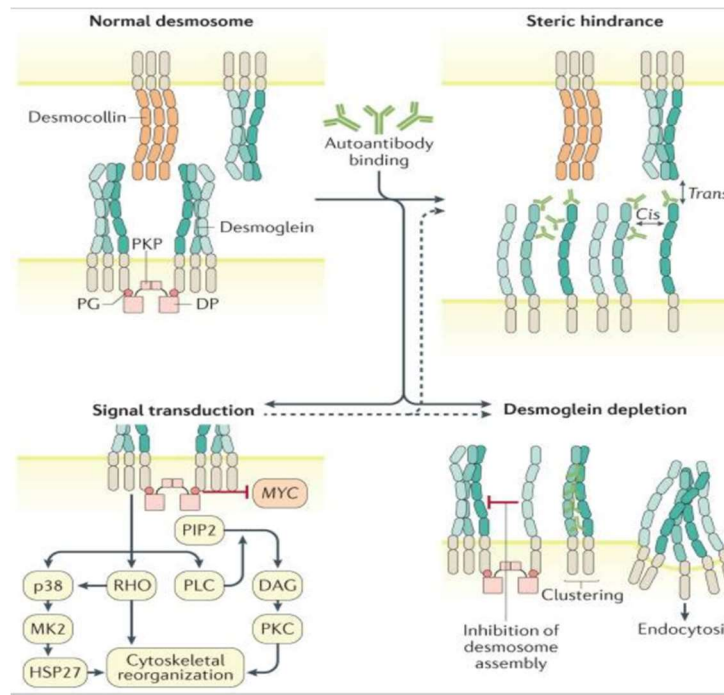


Figura 5 – Meccanismi di acantolisi.

Tratto da: Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. Nat Rev Dis Primers. 2017 May 11;3:17026. doi: 10.1038/nrdp.2017.26. PMID: 28492232; PMCID: PMC5901732.

La localizzazione cutanea e mucosa di Dsg1 e Dsg2 è stata oggetto di studi di immunofluorescenza che hanno rivelato come a livello della cute Dsg3 si esprime a livello della porzione basale e immediata soprabasale dell'epidermide e Dsg1 sia espresso maggiormente a livello della porzione superficiale dell'epidermide. A livello mucoso Dsg3 è espresso diffusamente mentre Dsg1 lo è lievemente e non a livello basale.

Per spiegare la distribuzione delle lesioni nel pemfigo è stata proposta nel 1999 da Amagai e Stanley, la “teoria della compensazione della desmogleina” che spiega la correlazione tra autoimmunità e fenotipo nei casi di pemfigo volgare e foliaceo. Secondo questa teoria, Dsg1 e Dsg3 sono coesprese nell'ambito di una stessa cellula per cui il mantenimento di un solo tipo di desmogleina è sufficiente per garantire l'integrità cutanea o mucosa.

In particolare a livello cutaneo in presenza di sieri contenenti solo IgG

anti Dsg3, la funzionalità di Dsg1 è mantenuta, risultando nel mantenimento, seppur limitato, dell'integrità intercheratinocitaria della porzione epidermica basale, con scarsa formazione di vescicole o addirittura assenza di evidenza. Contrariamente alla cute, a livello delle membrane mucose Dsg1 essendo solo lievemente espressa non riesce a compensare la perdita di Dsg3, tale per cui si avrà la formazione di numerose vesciche mucose. Dunque i sieri contenenti IgG anti Dsg3 sono responsabili dello sviluppo di pemfigo mucoso e con solo lieve interessamento cutaneo. Viceversa sieri IgG anti Dsg1 e Dsg3 determinano la comparsa del fenotipo mucocutaneo. (fig. 6)

A questo ne consegue da una parte una maggiore labilità di adesione intercheratinocitaria a causa della riduzione della quota di desmosomi e dall'altra una maggiore possibilità penetrativa degli anticorpi a livello del derma con conseguenti lesioni che diventano soprabasilari. (56)

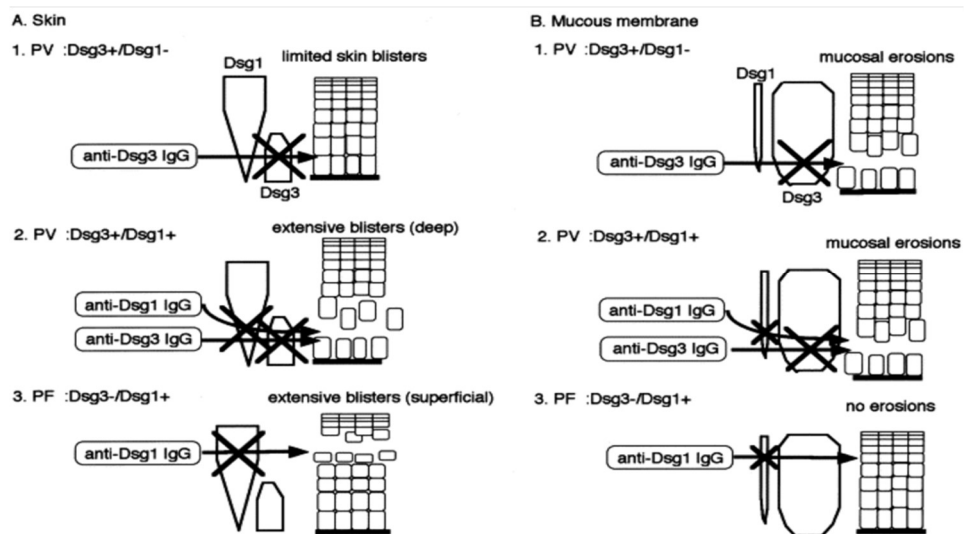


Figura 6 – Diagramma schematico della formazione di bolle di PV e PF nella pelle (A) e nella mucosa (B).

Tratto da: Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci.* 1999 Jun;20(2):92-102. doi: 10.1016/s0923-1811(99)00016-x. PMID: 10379702.

Mentre la produzione di autoanticorpi patogeni di tipo IgG4 rappresenta la chiave per lo sviluppo della malattia, ad oggi è noto come altrettanto

importante sia l'innescò degli altri processi immunologici che precedono l'induzione anticorpale. Il ruolo delle cellule T CD4⁺ autoreattive nella patogenesi del pemfigo (fig. 7) è stato comprovato dalla coltivazione in vitro di linfociti T e B ottenuti a partire da modelli murini, in particolare di cellule T reattive contro Dsg3 e cellule B derivate da modelli murini Dsg3^{-/-} ma immunizzati con Dsg3 stessa. E' emerso come una parte delle cellule T sia stata in grado di indurre la produzione di IgG anti Dsg3 portando alla comparsa dei segni clinici della malattia in topi Dsg3^{+/+}. Inoltre nelle linee cellulari T si è riscontrata la produzione di più alti livelli di IL-10 ma soprattutto IL-4, quest'ultima che da un'ulteriore analisi in vitro, si è vista essere fondamentale per la promozione della produzione di IgG, suggerendo un suo possibile ruolo come bersaglio terapeutico.

In merito al ruolo dei Treg nella soppressione dei linfociti B nel pemfigo volgare, è stato dimostrato come gli autoantigeni patogeni inducano la proliferazione delle cellule Treg che quindi agiscono direttamente sulle cellule B, determinandone l'apoptosi.

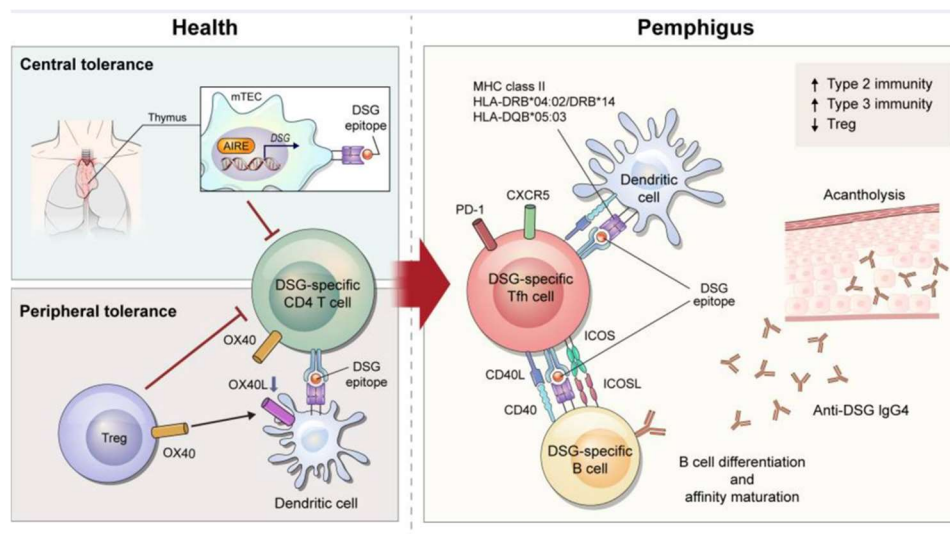


Figura 7 – Panoramica del meccanismo immunitario delle cellule T CD4⁺ specifiche della Dsg nel pemfigo.

Tratto da: Lee AY, Kim T, Kim JH. Understanding CD4⁺ T cells in autoimmune bullous diseases. *Front Immunol.* 2023 Apr 17;14:1161927. doi: 10.3389/fimmu.2023.1161927. PMID: 37138879; PMCID: PMC10149917.

I Th17 infine sono cellule che si formano dalla stimolazione dei linfociti T

naive con IL-17. Questa citochina in particolare è stata riscontrata ad alti livelli nel contesto delle lesioni cutanee degli affetti, tuttavia nel caso del pemfigo essa non correla né con la clinica né con i livelli di autoanticorpi circolanti. (57)

Clinica

Pemfigo Volgare

Il pemfigo volgare è caratterizzato dalla comparsa di vescicole e/o erosioni flaccide ad esordio soprattutto a livello del cavo orale. Le bolle integre sono rare, più comunemente si obiettivano erosioni a contorni irregolari in corrispondenza di gengive o palato. Localizzazioni mucose più rare sono rappresentate da congiuntiva, labbra, esofago, laringe, faringe, pene, vagina, cervice, ano, uretra. Successivamente alle lesioni sulle mucose, possono comparire anche erosioni cutanee sanguinanti che residuano con lesioni pigmentate dopo trattamento immunosoppressivo e raggiungimento della guarigione. Queste si localizzano preferenzialmente sul cuoio capelluto, torace, ascelle, viso, ombelico, inguine. (fig. 8)

Lo sviluppo del pemfigo nel corso della gravidanza è responsabile della comparsa di una condizione nota come pemfigo neonatale legato alla trasmissione transplacentare degli autoanticorpi responsabili della genesi di erosioni crostose che perdurano fino alla degradazione completa da parte del neonato degli autoanticorpi specifici.

Il pemfigo vegetale infine è una forma di pemfigo volgare caratterizzato dalla marcata tendenza a sviluppare vegetazioni papillomatoso-verrucose con dalla comparsa di vescicole nelle aree intertiginose, anogenitali e nasolabiali che evolvono in erosioni.

Durante la fase attiva del PV si potrà osservare positività al segno di Nikolsky diretto e indiretto. (58)



Figura 8 – A sinistra: manifestazione clinica di PV a livello mucoso. A destra: manifestazioni cutanee di PV con erosioni e croste sierose ed emorragiche, localizzate su aree seborroiche del tronco.

Tratto da: Costan VV, Popa C, Hâncu MF, Porumb-Andrese E, Toader MP. Comprehensive review on the pathophysiology, clinical variants and management of pemphigus (Review). *Exp Ther Med.* 2021 Nov;22(5):1335. doi: 10.3892/etm.2021.10770. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34630689; PMCID: PMC8495539.

Pemfigo foliaceo

Il pemfigo foliaceo clinicamente si caratterizza per la comparsa di lesioni esclusivamente cutanee in quanto Dsg1 a livello mucoso non è espresso. Le lesioni all'esordio si localizzano nelle aree seborroiche di cuoio capelluto, torace, viso. (fig. 9) Le vesciche si formano lentamente e vanno incontro a facile rottura a causa della flaccidità e proprio in ragione è alto il rischio di sviluppo di piodermite secondaria fino alla sepsi.

La forma endemica, detta fogo selvagem, si sviluppa soprattutto in donne giovani residenti in regioni endemiche ed è caratterizzata da erosioni accompagnate da dolore molto intenso.

La forma localizzata, detta Sdr di Senear-Usher, è contraddistinta da placche eritematose desquamanti a livello delle aree fotoesposte di cuoio capelluto, tronco e viso ed entra in diagnosi differenziale con il lupus eritematoso. Questa forma si sviluppa tipicamente in pazienti anziani ed ha come trigger esposizione solare, farmaci e traumi.

Nelle forme più estreme di PF e di fogo selvagem, le lesioni possono diventare confluenti ed evolvere in eritrodermia esfoliativa con coinvolgimento di più del 90% della superficie cutanea.

Anche in questo caso il segno di Nikolsky è positivo. (59)

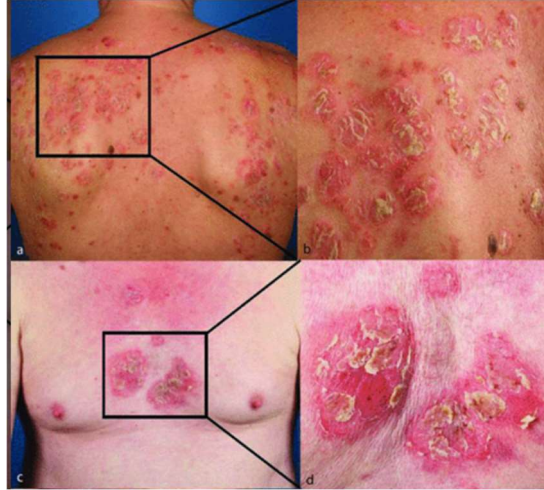


Figura 9 – Pemfigo foliaceo. Coinvolgimento preferenziale delle aree seborroiche (a, c), formazione di squame, croste e ipercheratosi (b, d).

Tratto da: Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. J Dtsch Dermatol Ges. 2011 Oct;9(10):844-56; quiz 857. English, German. doi: 10.1111/j.1610-0387.2011.07793.x. PMID: 21955378.

Diagnosi

La diagnosi di pemfigo è ottenuta innanzitutto attraverso l'inquadramento clinico di sintomi e segni, questi ultimi valutabili tramite ispezione delle aree interessate e ricerca della positività del segno di Nikolsky diretto e indiretto. Successivamente è possibile procedere valutando le caratteristiche istopatologiche del campione biotico ed esecuzione su questo di immunofluorescenza diretta. Infine si possono effettuare test sierologici quali immunofluorescenza indiretta ed ELISA. (fig. 10)

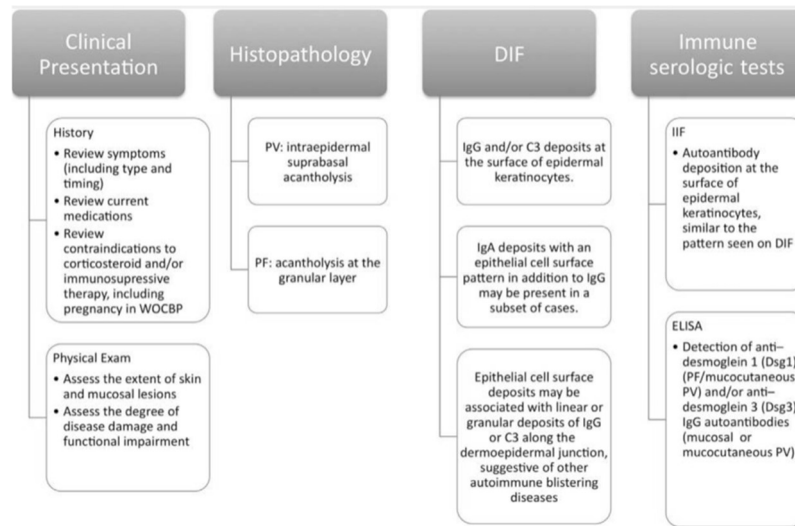


Figura 10 – Diagnosi di pemfigo.

Tratto da: Murrell DF, Peña S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, Sinha AA, Payne AS, Daneshpazhooh M, Eming R, Jonkman MF, Mimouni D, Borradori L, Kim SC, Yamagami J, Lehman JS, Saleh MA, Culton DA, Czernik A, Zone JJ, Fivenson D, Ujjie H, Wozniak K, Akman-Karakaş A, Bernard P, Korman NJ, Caux F, Drenovska K, Prost-Squarcioni C, Vassileva S, Feldman RJ, Cardones AR, Bauer J, Ioannides D, Jedlickova H, Palisson F, Patsatsi A, Uzun S, Yayli S, Zillikens D, Amagai M, Hertl M, Schmidt E, Aoki V, Grando SA, Shimizu H, Baum S, Cianchini G, Feliciani C, Iranzo P, Mascaró JM Jr, Kowalewski C, Hall R, Groves R, Harman KE, Marinkovich MP, Maverakis E, Werth VP. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol.* 2020 Mar;82(3):575-585.e1. doi: 10.1016/j.jaad.2018.02.021. Epub 2018 Feb 10. PMID: 29438767; PMCID: PMC7313440.

Esame istopatologico

Al fine di differenziare il pemfigo dalle altre malattie bollose è possibile procedere con l'esecuzione della biopsia e successivo esame istopatologico che permette di identificare soprattutto il livello di scissione a cui la vescica si è formata.

Nella scelta della lesione da biopsiare ci si orienta verso una vescica clinicamente di recente comparsa e che si inserisca in un punch di 4mm o in alternativa si può eseguire una escissione fusiforme per evitare la

rottura della vescicola stessa. Se non è possibile si procede su un'area perilesionale in maniera tale che l'apice della vescica sia adeso e non si stacchi durante l'esecuzione dell'istologia. (Fig. 11)

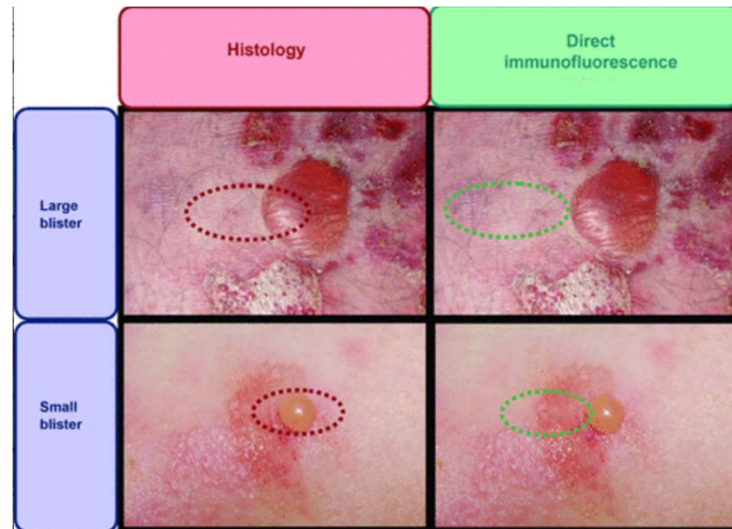


Figura 11 –Sito ottimale per la biopsia diagnostica.

Tratto da: Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011 Nov;9(11):927-47. English, German. doi: 10.1111/j.1610-0387.2011.07809.x. PMID: 22026362.

Il campione una volta ottenuto va fissato in formalina 10% ed infine analizzato, rivelando nel caso del pemfigo un clivaggio epidermico soprabasale con infiltrato di neutrofili e alcuni eosinofili. (60) In particolare nel caso del PV si ha acantolisi intraepidermica con cheratinociti ancora attaccati alla membrana basale e morfologia a “pietra tombale”. Nel PF l’acantolisi è corneale più superficiale. (Fig. 12) Nel pemfigo paraneoplastico le caratteristiche istologiche sono polimorfe con lesioni bollose con discheratosi e sparso infiltrato infiammatorio, contrariamente al pemfigo IgA in cui l’acantolisi è generalmente assente e si avranno vescicole intraepidermiche con infiltrato neutrofilico. (61)

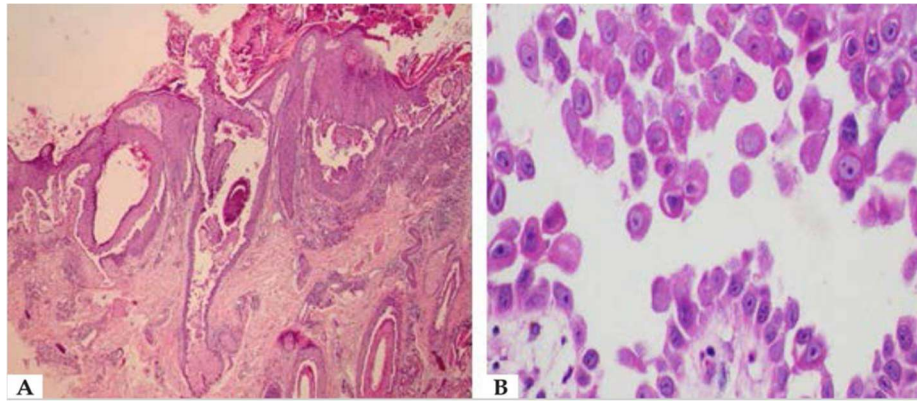


Figura 12 – A: bolla con livello di clivaggio soprabasale che interessa epidermide e epitelio follicolare (ematossilina ed eosina 40x). B: cheratinociti acantolitici nel contenuto del blister (ematossilina ed eosina 400x).

Tratto da: Porro AM, Seque CA, Ferreira MCC, Enokihara MMSES. Pemphigus vulgaris. *An Bras Dermatol.* 2019 Jul 29;94(3):264-278. doi: 10.1590/abd1806-4841.20199011. PMID: 31365654; PMCID: PMC6668932.

Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una metodica che si basa sulla reazione antigene-anticorpo marcato, al fine di rilevare specifici antigeni bersaglio. Questa tecnica non solo è in grado di confermarci il sospetto clinico, ma costituisce anche la base su cui possono essere effettuati test di livello superiore come ELISA e immunoblotting (IB).

○ *Immunofluorescenza diretta (DIF)*

L'immunofluorescenza diretta rappresenta il gold standard diagnostico e consiste nella valutazione del legame in vivo sul campione biotico degli anticorpi, ai complementari antigeni.

Per quanto riguarda la sede del prelievo biotico nel caso dell'immunofluorescenza diretta è indicato il prelievo della cute perilesionale (Fig. 11), in quanto i depositi autoanticorpali a livello della porzione di pelle infiammata o con vescicole vengono parzialmente o totalmente degradati, dando un esito falsamente negativo. L'interpretazione dell'esito si fonda su alcuni criteri: siti di deposizione

primaria (colorazione intercellulare ICS o zona della membrana basale BMZ), classe di immunoglobuline, modalità di deposizione anticorpale (lineare o granulare), numero di deposizioni immunitarie e deposizione in siti secondari. (62)

Nelle diverse varianti di pemfigo il DIF della cute perilesionale mostrerà un legame reticolare di IgG (anti Dsg3 ed eventualmente anche anti Dsg1 nel caso di forma mucocutanea) e/o C3 a livello della superficie dei cheratinociti epidermici. (Fig. 13) Nel pemfigo paraneoplastico i depositi lineari (differentemente da PV e PF) di IgG e/o C3 possono essere rilevati sulla superficie dei cheratinociti epidermici e lungo la giunzione dermo-epidermica solo in meno del 50% dei casi. Nel caso specifico del pemfigo IgA si rilevano invece immunoglobuline IgA. (63)

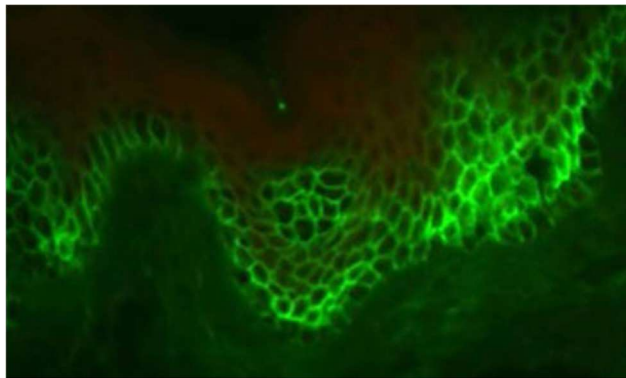


Figura 13 – Immunofluorescenza diretta con modesta intensità per IgG e C3 a distribuzione della fluorescina intercellulare.

Tratto da: Porro AM, Seque CA, Ferreira MCC, Enokihara MMSES. Pemphigus vulgaris. *An Bras Dermatol.* 2019 Jul 29;94(3):264-278. doi: 10.1590/abd1806-4841.20199011. PMID: 31365654; PMCID: PMC6668932.

○ *Immunofluorescenza indiretta (IIF)*

L'immunofluorescenza indiretta è un esame che rileva la quota di autoanticorpi circolanti nel siero del paziente, differentemente dalla immunofluorescenza diretta che rileva la controparte legata al tessuto. Caratteristico è il pattern reticolare di reattività della superficie delle cellule epiteliali con gli anticorpi IgG (Fig. 14). Come substrato viene utilizzato solitamente esofago di scimmia.

I modelli per l'esecuzione della IIF, seppur somiglianti a quelli utilizzati nel caso della DIF, sono caratterizzati da minore sensibilità. Nel contesto delle dermatosi bollose autoimmuni l'utilizzo di pelle umana a spessore parziale divisa in sale, ossia incubata in NaCl 1M, permette di ottenere una spaccatura a livello della giunzione dermo-epidermica e quindi di effettuare diagnosi differenziale tra pemfigo, pemfigoide anti-laminina y e epidermolisi bollosa. Nel primo caso rileveremo fluorescenza sul versante epidermico, mentre negli ultimi due casi su quello dermico. (64) La procedura prevede di diluire il siero del paziente 1:20 e di incubarlo con il substrato. Vengono quindi addizionati anticorpi secondari anti IgG umani coniugati con isotiocianato di fluorescina. Il risultato corrisponderà al titolo maggiore a cui viene ancora osservata la fluorescenza, valutata tramite epiluminescenza. Nel pemfigo si osserva prevalenza di IgG4, mentre le IgG1 sono invece di più comune riscontro nel PV cronico. (65)

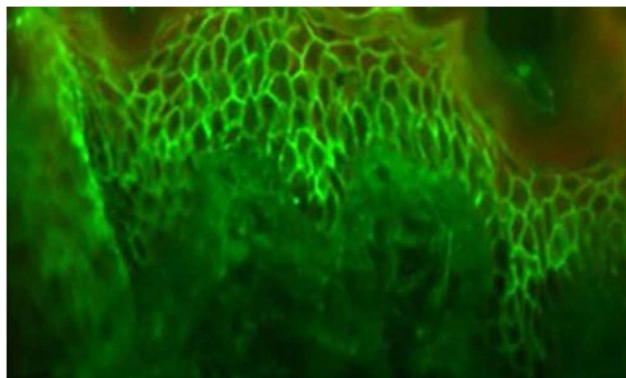


Figura 14 – Immunofluorescenza indiretta con IgG intraepiteliale intercellulare.

Tratto da: Porro AM, Seque CA, Ferreira MCC, Enokihara MMSES. Pemphigus vulgaris. *An Bras Dermatol.* 2019 Jul 29;94(3):264-278. doi: 10.1590/abd1806-4841.20199011. PMID: 31365654; PMCID: PMC6668932.

Test sierologici di conferma

I test sierologici di conferma rappresentano l'ultimo step nella diagnosi del pemfigo.

Per quanto riguarda il test sierologico ELISA (Enzyme- Linked –

Immunosorbent Assay) nel contesto del pemfigo, esso rileva autoanticorpi IgG anti desmogleina 1 (PF/PV mucocutaneo) e anti desmogleina 3 (PV mucoso o mucocutaneo). Risulta quindi particolarmente utile per porre diagnosi differenziale tra PV e PF.

Le proteine ricombinanti Dsg3 e Dsg1 sono prodotte dall'espressione di Baculovirus ed utilizzate per la caratterizzazione anticorpale. ELISA è un test molto sensibile e specifico nella rilevazione di IgG anti Dsg1 e IgG anti Dsg 3. Si tratta di un metodo quantitativo il cui risultato dimostra una buona correlazione con la gravità clinica e può essere utile nell'ambito del follow up. (66) ELISA inoltre si è dimostrato superiore all'IF indiretto eseguito su esofago di scimmia. (67)

Successivamente all'esecuzione del saggio è possibile trovarsi davanti a diversi scenari: forma cutanea dominante di PV in cui si rilevano preferenzialmente anticorpi anti Dsg1, PV mucoso dominante in cui vi è la positività per anticorpi anti Dsg3 e la forma mucocutanea con positività di entrambi i profili anticorpali. Nel PF si hanno solo IgG anti Dsg1. Tuttavia la valutazione di IgG e IgA sieriche contro Dsg non ha un ruolo rilevante nella diagnosi di PF e PV. (35)

Immunoblotting e immunoprecipitazione come test sono poco impiegati nella clinica.

Criteria necessari per la diagnosi di pemfigo volgare/foliaceo
In caso delle seguenti costellazioni, si raccomanda di effettuare la diagnosi di PV/PF:
▶ Quadro clinico compatibile e microscopia IF diretta positiva
▶ Quadro clinico appropriato e reattività con desmogleina 1 o 3 mediante ELISA/in cellule trasfettate
▶ Quadro clinico compatibile e corrispondente istopatologia e microscopia IF indiretta positiva su sezioni di esofago di scimmia

Figura 15 – Riassunto dei criteri diagnostici del pemfigo.

Tratto da: Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sárdy M, Sitaru C, Eming R, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Orzechowski HD, Pfeiffer C, Schuster V, Sporbeck B, Sticherling M, Worm M, Zillikens D, Nast A. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. J Dtsch Dermatol Ges. 2015 Jul;13(7):713-27. English, German. doi: 10.1111/ddg.12612. PMID: 26110729.

Trattamento

Gli obiettivi del trattamento sono rappresentati del controllo della sintomatologia, della comparsa di lesioni su cute e mucose oltre che dalla riduzione al minimo eventuali effetti avversi legati al trattamento farmacologico stesso. In generale si può agire progressivamente impostando innanzitutto una terapia di prima linea con corticosteroidi e anti CD20 ed eventualmente si possono introdurre agenti risparmiatori di corticosteroidi di prima linea o successivi. (Fig. 16)

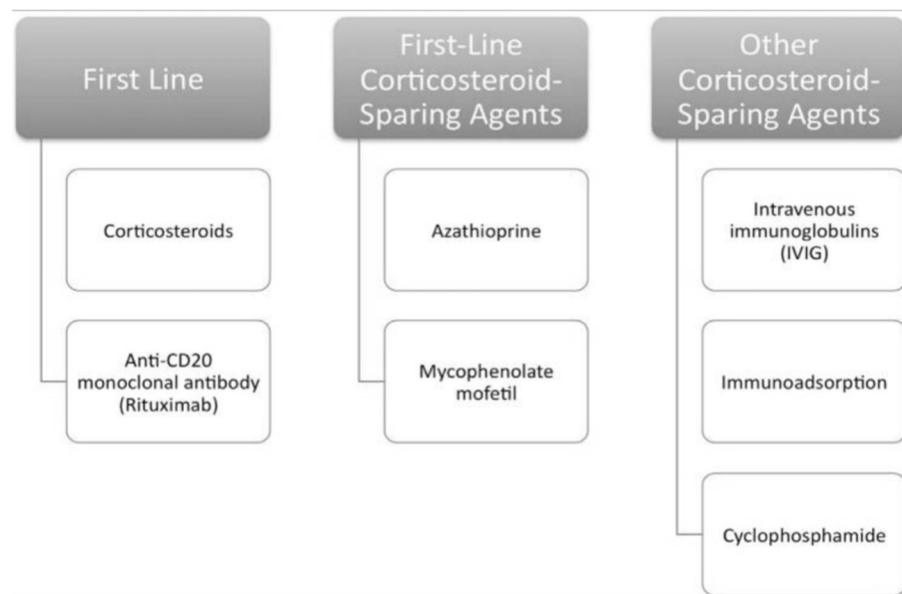


Figura 16 – Opzioni terapeutiche nel trattamento del pemfigo.

Tratto da: Murrell DF, Peña S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, Sinha AA, Payne AS, Daneshpazhooh M, Eming R, Jonkman MF, Mimouni D, Borradori L, Kim SC, Yamagami J, Lehman JS, Saleh MA, Culton DA, Czernik A, Zone JJ, Fivenson D, Ujiie H, Wozniak K, Akman-Karakaş A, Bernard P, Korman NJ, Caux F, Drenovska K, Prost-Squarcioni C, Vassileva S, Feldman RJ, Cardones AR, Bauer J, Ioannides D, Jedlickova H, Palisson F, Patsatsi A, Uzun S, Yayli S, Zillikens D, Amagai M, Hertl M, Schmidt E, Aoki V, Grando SA, Shimizu H, Baum S, Cianchini G, Feliciani C, Iranzo P, Mascaró JM Jr, Kowalewski C, Hall R, Groves R, Harman KE, Marinkovich MP, Maverakis E, Werth VP. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol.* 2020 Mar;82(3):575-585.e1. doi: 10.1016/j.jaad.2018.02.021. Epub 2018 Feb 10. PMID: 29438767; PMCID: PMC7313440.

Corticosteroidi

I corticosteroidi sistemici rientrano all'interno della terapia di prima linea nel trattamento del pemfigo e ne può essere combinata l'assunzione ad adiuvanti immunosoppressivi come l'azatioprina o il micofenolatomofetile.

I corticosteroidi esplicano la loro azione attraverso l'aumento della produzione di citochine antiinfiammatorie e l'inibizione della produzione della corrispettiva quota proinfiammatoria interagente con il recettore citoplasmatico dei corticosteroidi. Il risultato dell'interazione tra steroidi e recettore citoplasmatico sarà la riduzione dell'espressione dei fattori di trascrizione e delle molecole coattivatrici come NF-Kb e proteina attivatrice 1. Si avrà anche la down regulation di IL-2 che causa secondariamente una riduzione dell'espansione dei cloni B produttori di anticorpi, oltre che inibizione della proliferazione cellulare T. Gli effetti complessivi saranno antinfiammatori, immunosoppressivi, antiproliferativi e vasocostrittori. (68)

La dose giornaliera che viene impostata inizialmente è variabile, dai protocolli è indicato 1 mg/Kg e se il controllo non è raggiunto entro tre settimane si aumenta il dosaggio a 1.5 mg/Kg/die. Al raggiungimento del controllo della malattia, le dosi andrebbero ridotte del 25% a settimane alterne. (69)

Dal punto di vista della gestione clinica in termini di tasso di recidiva e durata delle remissioni non si sono evidenziate differenze nei pazienti trattati con terapia corticosteroidica ad alte (120-180 mg/die) o basse dosi (40-60 mg/die). Dalla letteratura emerge come la terapia ad impulsi per via e.v. non dia effettivamente un beneficio aggiuntivo rispetto alla terapia convenzionale con prednisone orale e immunosoppressivi e dovrebbe essere presa in considerazione nel momento in cui la dose necessaria si rivelasse superiore a 100 mg/die. (70)

Tra gli effetti collaterali legati alla terapia steroidea cronica ricordiamo una maggiore suscettibilità infettiva, insufficienza surrenalica secondaria, osteoporosi, iperglicemia, ipertensione e sviluppo di cataratta precoce. Per questo motivo è indicato procedere al trattamento

con le dosi minime che garantiscono il controllo della malattia e per il minor tempo possibile. (71)

Adiuvanti immunosoppressivi

○ Azatioprina (AZA)

Si tratta di un farmaco immunosoppressore agente da risparmiatore di corticosteroidi, utilizzato in associazione a quest'ultimi in prima linea terapeutica. Per azione della TPMT (tiopurina metiltransferasi) nell'inibizione della 6-mercaptopurina, è importante definire il dosaggio iniziale di farmaco in dipendenza dalla attività enzimatica prima dell'inizio del trattamento. Inizialmente è raccomandata l'assunzione di una dose pari a 50 mg/die che può essere aumentata in base all'attività enzimatica rilevata. Per quanto riguarda gli effetti avversi si cita mielosoppressione, pancitopenia, epatotossicità, aumento rischio infettivo e neoplastico. (72)

Dal punto di vista del meccanismo d'azione, AZA è un agente immunosoppressivo assunto in forma di profarmaco, che si trasforma in 6-mercaptopurina e avente diversi effetti sistemici come: la riduzione del metabolismo delle purine con deficit di substrati per la produzione di DNA, RNA che quindi non garantiscono più un'adeguata sintesi proteica, la riduzione della mitosi, l'induzione dell'immunosoppressione con calo di monociti, cellule di Langerhans, soppressione dell'attività dei linfociti T e B e della produzione di IgG. (73)

In un randomised controlled trial è stato selezionato un campione di pazienti con PV e si è valutata la terapia combinata di corticosteroidi e AZA adiuvante, dove si è visto come la combinazione garantisca un maggiore risparmio corticosteroidico rispetto alla sola terapia con steroidi o ad una terapia di associazione con micofenolatomofetile. (74)

In un precedente studio randomizzato controllato al follow up ad 1 anno, l'assunzione di AZA adiuvante (2,5 mg/Kg/die) rispetto alla sola terapia con corticosteroidi ha garantito una significativa riduzione dell'attività di malattia nel gruppo che assumeva solo AZA, oltre che risparmio di steroidi assunto, in entrambi i casi negli ultimi tre mesi. (75)

○ *Micofenolato mofetile*

Il micofenolato rientra nella categoria di farmaci immunosoppressori adiuvanti di prima linea nel trattamento del pemfigo, che al pari dell'AZA funge da risparmiatore di steroidi.

Si tratta di un profarmaco che una volta assunto per os si converte in acido micofenolico (MPA). Esso in particolare opera attraverso il blocco di sintesi de novo delle purine attraverso la compromissione selettiva dell'enzima inosina monofosfato deidrogenasi da cui dipendono i linfociti B e T, agendo sia a livello dell'immunità umorale che cellulare.

(76)

Per quanto riguarda la dose da somministrare si inizia con 2 g/die suddivisa in due dosi per garantire migliore tolleranza gastrointestinale.

(73)

Per quanto riguarda gli effetti avversi ricordiamo i sintomi gastrointestinali, le rare infezioni opportunistiche e le alterazioni ematologiche. (77) Da sottolineare è comunque il riscontro in pazienti trapiantati di un aumento del rischio di sviluppo di tumori cutanei e linfomi. (78)

In letteratura sono riportati studi in cui si è confrontato l'uso di corticosteroidi con MMF contro il solo corticosteroide, evidenziando nel primo gruppo una risposta terapeutica più rapida oltre che intervallo libero da malattia più lungo e risparmio di steroide stesso, tuttavia MMF non era superiore a CS nel controllo della malattia. (79)

Riportiamo altresì come in letteratura non si siano dimostrate significative differenze in termini di efficacia o sicurezza nelle combinazioni steroide+MMF (2g/die) e steroide+AZA. Per quanto riguarda l'effetto di risparmio dello steroide, MMF era superiore al prednisolone in monoterapia ma inferiore ad AZA. (74)

Rituximab

Il rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico anti CD20 che risulta formato da una componente Fc umana e da una regione variabile murina che funge da sito di legame per CD20. Esso agisce contro CD20, è un recettore transmembrana, espresso in vari stadi di sviluppo della cellula B, dalla

cellula pre-B a quella matura. Il rituximab è una terapia altamente efficace nel pemfigo refrattario alle altre terapie infatti riduce le cellule B CD20-positive e mature pronte a trasformarsi in plasmacellule, abbassando la quota di autoanticorpi circolanti anti-Dsg e conseguente miglioramento delle lesioni. (80)

È emerso tuttavia che l'azione del rituximab si espliciti attraverso la modulazione sia sull'immunità umorale che acquisita nel pemfigo, spiegando il fatto che in molti casi il miglioramento della malattia dura più a lungo della ricomparsa delle cellule B nel sangue periferico del pazienti. (81)

Per l'impostazione della corretta dose terapeutica sono utilizzati due protocolli principali: il protocollo per l'artrite reumatoide che consiste in due infusioni a distanza di 2 settimane da 1.000 mg e il protocollo per il linfoma che prevede l'effettuazione una volta alla settimana di quattro infusioni da 500 mg. In generale i regimi ad alte dosi dovrebbero essere preferiti rispetto ai regimi a basse dosi, a causa della risposta più lunga alla malattia. Gli effetti collaterali includono principalmente infezioni ed eventi avversi correlati all'infusione. (82)

4. MALATTIE BOLLOSE DEL GRUPPO DEL PEMFIGOIDE

Le malattie bollose appartenenti al gruppo del pemfigoide sono patologie bollose autoimmuni caratterizzate dalla produzione di autoanticorpi rivolti contro le componenti emidemosomiali, a cui consegue la comparsa di lesioni vescicolari subepidermiche.

La forma più frequente è rappresentata dal pemfigoide bolloso (BP), in cui si ha la formazione di gammaglobuline rivolte contro degli antigeni BP230 e BP180 localizzati in corrispondenza della membrana basale. (83) Altre forme sono rappresentate dal pemfigoide gestazionale, pemfigoide delle membrane mucose (MMP), dermatosi IgA lineari, epidermolisi bollosa acquisita (EBA), dermatite erpetiforme di Duhring.

La diagnosi differenziale tra i diversi sottotipi di pemfigo è effettuata in base a criteri clinici, istologici e sulla base degli antigeni target degli autoanticorpi circolanti.

4.1 Pemfigoide gestazionale

Si tratta di una patologia del gruppo del pemfigoide che si sviluppa nel corso della gravidanza, soprattutto tra II e III trimestre, ma talora anche nel post parto, in cui si ha lo sviluppo di autoimmunità contro BP180 NC16A. BP180 è espresso nella membrana amniotica, mentre il dominio NC16A si trova disperso nel liquido amniotico. Clinicamente si ha la comparsa delle tipiche papule e placche orticarioidi altamente pruriginose in regione periombelicale, molto simili all'eritema multiforme. (Fig. 17A) La progressione della malattia prevede poi una diffusione su addome e cosce. Le lesioni sono caratterizzate da distribuzione raggruppata e per questo era denominato "herpes gestaionis". Il decorso clinico è solitamente benigno con una durata media di 4-6 mesi. La cronicizzazione si verifica nel 5% delle pazienti con evoluzione in pemfigoide bolloso. È una condizione che una volta sviluppata una volta, tende a ripresentarsi nel 90% dei casi alla successiva gravidanza. Si sottolinea una lieve aumento del rischio di nascita prematura e di neonati piccoli per età gestazionale. (84)

4.2 Pemfigoide delle membrane mucose (MMP)

Si tratta di una patologia immunobollosa caratterizzata formazione di vescicole a livello mucoso e assenza o eventuale raro coinvolgimento cutaneo. (85)

Gli anticorpi rilevabili sono rivolti contro gli antigeni BP180, BP230, laminina 5 e integrina beta4. Quest'ultima quando rilevata tipicamente è associata a coinvolgimento oculare. Da sottolineare è il fatto che la contestuale polireattività antigenica si è vista determinare fenotipi di maggiore gravità. (86)

Dal punto di vista della clinica, le lesioni si localizzano soprattutto a livello del cavo orale, ma possono comparire anche a livello della congiuntiva (Fig. 17B), mucosa nasofaringea, laringe, esofago ed esitano nella cicatrizzazione delle membrane mucose. Questi esiti potranno essere lievi nel caso di un interessamento della mucosa orale e nasofaringea, tuttavia se la malattia si localizza a livello esofageo o tracheale è possibile l'evoluzione verso l'ostruzione completa del lume delle vie digestive o aeree con exitus del paziente. Nella forma di MMP oculare si ha una congiuntivite cicatrizzante

cronica che nel tempo provoca l'obliterazione dei fornici congiuntivali (simblefaron) ulcerazione, cicatrizzazione della congiuntiva e infine cecità. (87)

4.3 Dermatosi IgA lineari

Si tratta di una malattia che si caratterizza per la deposizione lineare di IgA alla giunzione dermo-epidermica visibile con immunofluorescenza diretta. Come target degli autoanticorpi IgA si ha BP180, per le IgG si ha BP180. Clinicamente si osservano erosioni, placche orticarioidi, lesioni ad anello con vescicole che ne delimitano il bordo e formanti il segno del filo di perle. Molto frequente è l'interessamento mucoso del cavo orale e nasale oltre che genitale. Nei bambini è comune la localizzazione perineale e del volto, mentre negli adulti le lesioni prevalgono sugli arti e tronco. (88)

Spesso si tratta di una condizione scatenata dall'assunzione di farmaci come la vancomicina. (89)

4.4 Epidermolisi bollosa acquisita

Si tratta di una patologia caratterizzata dalla formazione di autoanticorpi contro il collagene VII che può essere distinta in due varianti. La variante classica meccanobollosa si localizza a livello della cute delle porzioni estensorie con comparsa di vescicole tese e guarigione cicatriziale con formazione di milia, nonché alterazione della pigmentazione cutanea sia in eccesso che in difetto. La variante infiammatoria assomiglia al MMP o al pemfigoide bolloso. In entrambi i sottotipi nella metà dei pazienti le mucose risultano coinvolte. (90)

4.5 Dermatite erpetiforme di Duhring

La dermatite erpetiforme è una patologia cutanea in cui si rilevano depositi di IgA sulle papille dermiche o lungo la membrana basale e che si associa all'enteropatia sensibile al glutine. Solo nel 10-20% dei casi si ha contestualmente enteropatia manifesta, tuttavia alla biopsia del digiuno si rileva frequentemente atrofia dei villi intestinali o eventualmente infiammazione digiunale caratteristica della celiachia. Nell'infanzia tipicamente si associa invece a celiachia sintomatica. L'esordio si verifica intorno alla II-V decade con maggiore

predominanza negli uomini. Clinicamente i soggetti presentano intenso prurito, bruciore, papule e vescicole erpetiformi a grappolo. Solitamente le lesioni sono simmetriche e localizzate sulle spalle, area ileosacrale e glutea, superfici estensorie di gomiti (Fig. 17C) e ginocchia. (91)



Figura 17 – A: Pemfigoide gestationis con placche orticarioidi che coinvolgono l'addome. B: Pemfigoide delle membrane mucose con perdita delle ciglia inferiori, cicatrizzazione della palpebra inferiore ed ectropion. C: Dermatite erpetiforme con erosioni e vescicole su base eritematosa che interessano la superficie estensoria dell'arto superiore.

Tratto da: Montagnon CM, Tolkachjov SN, Murrell DF, Camilleri MJ, Lehman JS. Subepithelial autoimmune blistering dermatoses: Clinical features and diagnosis. *J Am Acad Dermatol.* 2021 Jul;85(1):1-14. doi: 10.1016/j.jaad.2020.11.076. Epub 2021 Mar 5. PMID: 33684496.

4.6 Pemfigoide bolloso (BP)

Epidemiologia

Si tratta della patologia più frequente nell'ambito delle dermatosi bollose autoimmuni. In particolare il pemfigoide bolloso mondialmente è caratterizzato da un'incidenza annuale pari a 2.4-21.7 casi su milione di abitanti all'anno, la quale è ancora più elevata in alcune aree geografiche come il Regno Unito e la Germania. Nonostante l'elevata incidenza è considerata una patologia rara con un numero di casi inferiore a 5 pazienti affetti su 100.000 annualmente.

Dal punto di vista dell'età di esordio essa varia intorno alla VI-VIII decade con trend in aumento all'aumentare dell'età stessa. Possiamo dunque affermare che sia quindi tipica della popolazione anziana, contrariamente al normale andamento di insorgenza delle malattie

autoimmuni, che sono insorgono nei giovani adulti. Le donne sono il genere maggiormente colpito dalla patologia, anche se vi sono evidenze di come dopo la VII decade questo andamento si inverte a favore del sesso maschile. (92)

Patogenesi

La patogenesi del pemfigoide bolloso è da attribuire ad una causa immunologica, che è stata dimostrata dalla rilevazione del legame di IgG e C3 alla membrana basale in biopsie cutanee oltre che con il riscontro di anticorpi anti membrana basale sierici in pazienti con malattia attiva. (93) In particolare si ha lo sviluppo di autoimmunità contro due specifici epitopi facenti parte delle strutture emidesmosomiali.

Il primo antigene è rappresentato dal dominio C-terminale di BP230 che è una proteina citoplasmatica facente parte della famiglia plakin che si occupa di garantire l'ancoraggio dei filamenti intermedi al citoscheletro. L'autoimmunità contro BP230 si sviluppa a seguito dello spreading antigenico.

Il secondo antigene è costituito dalla proteina transmembrana BP180 attraversante la lamina lucida in corrispondenza della membrana basale che è dotata di un dominio extracellulare denominato NC16A che si è visto essere il principale epitopo antigenico nello sviluppo della malattia. In alcuni casi nei pazienti affetti, oltre allo sviluppo di anticorpi anti NC16A, si ha lo sviluppo di immunoglobuline contro epitopi differenti. Entrambi gli epitopi comunque, se integri, garantiscono il corretto funzionamento dell'emidesmosoma e con esso anche della coesione subepidermica.

La presentazione antigenica ai linfociti T CD4+ determinate lo sviluppo della patologia, si è visto essere associata ad HLA-DQB1*03:01. Inoltre La malattia può essere indotta anche da farmaci come quelli contenenti gruppi sulfidrilici, che fungono da apteni spostandosi in prossimità della giunzione dermo-epidermica e alterandone le proprietà antigeniche, scatenano la risposta autoimmune. (94)

Gli autoanticorpi IgG rivolti contro BP180 NC-16A che danno avvio allo sviluppo della patologia, appartengono alle sottoclassi IgG1 e IgG4. (95)

Gli eventi che seguono il loro legame all'antigene specifico sono rappresentati innanzitutto dall'attivazione del complemento che determina da una parte la degranolazione dei mastociti a cui consegue la migrazione degli eosinofili e rilascio di mediatori tra cui IL-8, e dall'altra ulteriore chemiotassi di neutrofili ed eosinofili. I neutrofili in particolare una volta disposti sulla membrana basale, liberano enzimi proteolitici come l'elastasi neutrofila e la metalloproteasi-9 della matrice che degradano le proteine della matrice extracellulare tra cui NC16A con formazione delle tipiche vescicole subepidermiche. (Fig. 18)

Gli autoanticorpi potrebbero anche interferire direttamente con la funzione degli antigeni bersaglio o attivare una trasduzione del segnale intracellulare che porta a un'induzione di citochine pro-infiammatorie.

(96)

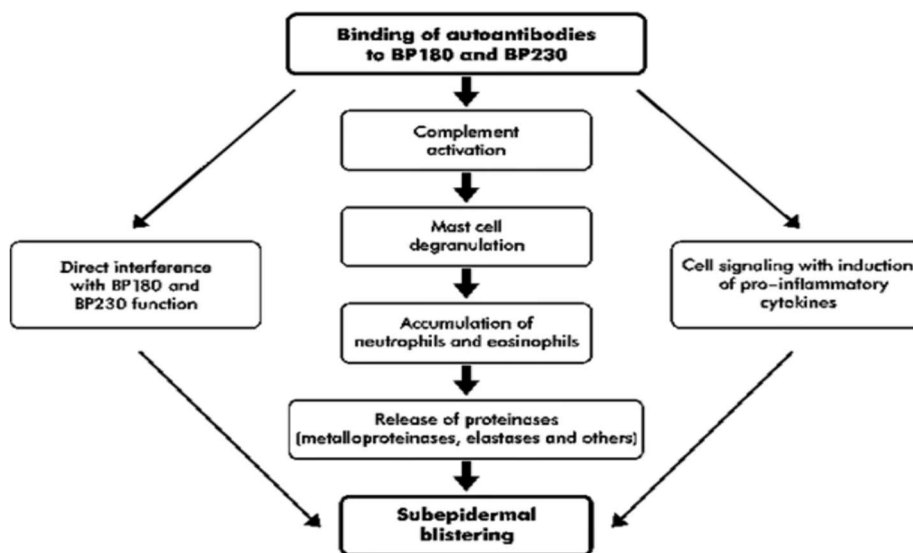


Figura 18 – Meccanismi proposti di formazione di bolle subepidermiche nel pemfigoide bolloso sperimentale.

Tratto da: Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. Clin Rev Allergy Immunol. 2007 Oct;33(1-2):67-77. doi: 10.1007/s12016-007-0030-y. PMID: 18094948.

Il coinvolgimento delle IgE, rivolte contro il dominio intracellulare di BP180, nella patogenesi del pemfigoide bolloso riguarda l'induzione dell'internalizzazione di BP180 esposto in superficie, con riduzione conseguente dell'adesione dei cheratinociti basali. (97)

Nei pazienti affetti da PB inoltre è stata rilevata la presenza di cellule T autoreattive circolanti, rese attive a seguito del legame con immunoglobuline, presenti nella fase attiva di malattia e assenti invece in fase di remissione. Esse sono a loro volta sono responsabili dell'induzione di una grande varietà di risposte mediate dai linfociti B fino alla cross-reattività dell'epitopo originale. La stimolazione delle cellule B è garantita dai Th2 e dall'IL-4, quest'ultima in particolare regola il cambio di isotipo ad IgG e ad IgE con produzione rispettivamente nel primo caso di IgG4 e nel secondo di IgE. I Treg invece sopprimendo i linfociti T autoreattivi mantengono la tolleranza, anche se i loro ruoli nella patogenesi del BP ad oggi non è ben chiara. Per quanto riguarda il ruolo controverso delle cellule Th17 promuoventi il processo autoimmune, dalle evidenze emerge come i linfociti IL-17A⁺ CD4⁺ siano elevati nel sangue periferico di pazienti affetti da BP e nelle lesioni cutanee e questo può essere spiegato dal fatto che IL-17 promuove la secrezione di metalloproteinasi-9 da parte di monociti e macrofagi con secondaria formazione di bolle. (98)

Clinica

Clinicamente il pemfigoide bolloso può essere ulteriormente classificato in quattro tipologie sulla base delle cause scatenanti, dell'età di insorgenza e della modalità di presentazione.

Forma classica

Si tratta di una variante che interessa soggetti prevalentemente appartenenti alla VII decade, con comparsa di lesioni alle estremità, sul tronco in particolare a livello ascellare simmetricamente e addominale. (Fig. 19) Si ha la formazione di vescicole tese su fondo o meno eritematoso con distribuzione che può essere localizzata o talvolta diffusa. Raramente si ha interessamento della mucosa, un 10-30% dei pazienti infatti presenta lesioni orali, esofagee e genitali. Le bolle sono caratterizzate da un essudato chiaro e tendono a regredire dando origine ad erosioni. (99)

La forma classica può manifestarsi anche su un substrato di lichen planus con papule, placche violacee pruriginose e bolle, sia sulle lesioni lichenoidi

che su cute normale. È possibile osservare in questi pazienti anche reticoli biancastri a livello della mucosa orale. Si parla in questo caso di lichen planus pemfigoide. (100)



Figura 19 – Pemfigoide bolloso. A-B: placche eritematose orticarie e infiltrate con vescicole tese, vescicole, erosioni e croste sul tronco. C: vesciche sierose tese che si formano sulle placche infiltrate della coscia. D: pemfigoide bolloso localizzato sul piede sinistro.

Tratto da: Di Zenzo G, Della Torre R, Zambruno G, Borradori L. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. Clin Dermatol. 2012 Jan-Feb;30(1):3-16. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.03.005. PMID: 22137222.

Forma non bollosa

La forma non bollosa del pemfigoide bolloso è caratterizzata obiettivamente dalla comparsa di intenso prurito, lesioni orticarioidi su base eritematosa, papule, noduli ed escoriazioni. Si tratta di un'entità patologia introdotta nel momento in cui da studi è stato reso noto come esistano delle forme di

pemfigoide bolloso prive di evoluzione verso la fase bollosa vera e propria, che si è vista manifestarsi solo nel 9,8% dei pazienti. (101)

Eritroderma esfoliativo

Si tratta di una rara variante di pemfigoide bolloso caratterizzato da assenza di vescicole ma con eritema generalizzato e desquamazione. Tuttavia esso ha una modalità di presentazione sovrapponibile ad altre condizioni patologiche come l'eczema, la psoriasi, le reazioni a farmaci e pemfigo foliaceo tale per cui la diagnosi è di difficile raggiungimento. (102)

Forma infantile

Si tratta di una forma che colpisce i soggetti in età precoce con due picchi di incidenza intorno ai 4 mesi e gli 8 anni. Le lesioni sono tipicamente generalizzate e si localizzano prevalentemente a livello del viso ma anche a livello dei palmi delle mani e dei piedi, per le quali è necessario iniziare precocemente il trattamento con steroidi. (103)

Diagnosi

La diagnosi di pemfigoide è ottenuta innanzitutto attraverso l'inquadramento clinico di sintomi e segni, questi ultimi valutabili tramite ispezione delle aree interessate e ricerca della negatività del segno di Nikolsky diretto e indiretto. Successivamente è possibile procedere valutando le caratteristiche istopatologiche del campione biptico ed esecuzione su questo di immunofluorescenza diretta. Infine si possono effettuare test sierologici quali immunofluorescenza indiretta ed ELISA. (Fig. 20)

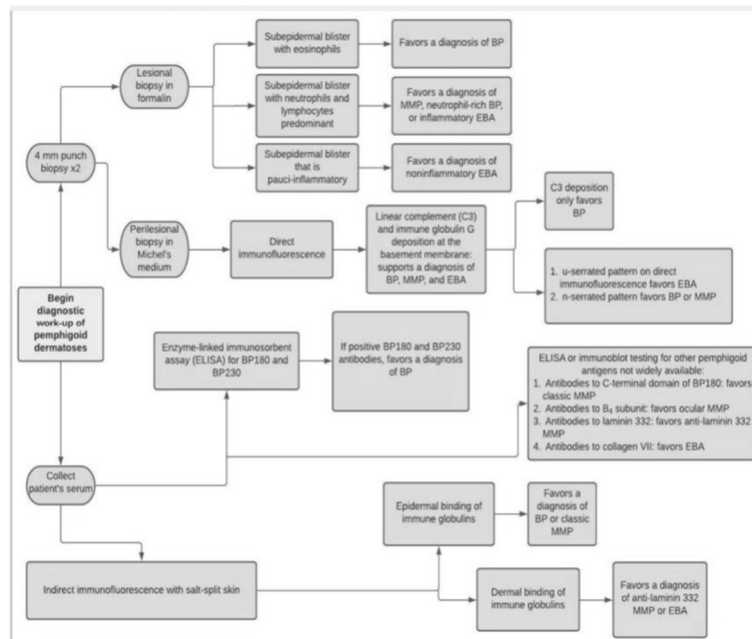


Figura 20 – Work-up diagnostico delle dermatosi pemfigoidi.

Tratto da: Pratasava V, Sahni VN, Suresh A, Huang S, Are A, Hsu S, Motaparathi K. Bullous Pemphigoid and Other Pemphigoid Dermatoses. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 4;57(10):1061. doi: 10.3390/medicina57101061. PMID: 34684098; PMCID: PMC8539012.

Istopatologia

L'esame istopatologico nel caso di pemfigoide bolloso viene eseguito su biopsia completa di una bolla intatta e se questo non è realizzabile si preferisce procedere al prelievo di un campione contenente uguale quantità cute lesionata e aerea perilesionale, per evitare il distacco del tetto vescicale durante l'elaborazione del campione.

In presenza di pemfigoide bolloso è caratteristica una scissione subepidermica con infiltrato infiammatorio costituito da eosinofili ma anche neutrofili e linfociti. (Fig. 21) A livello dermo-epidermico la distribuzione leucocitaria è lineare con eosinofili all'interno della vescicola e del derma papillare. (104)

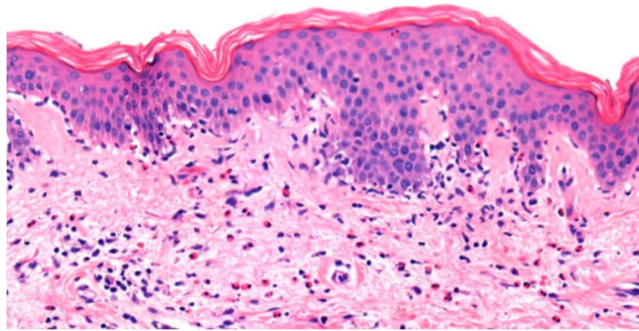


Figura 21 – Pemfigoide bolloso orticarioide con infiltrato principalmente eosinofilo nel derma e/o spongiosi eosinofila

Tratto da: Pratasava V, Sahni VN, Suresh A, Huang S, Are A, Hsu S, Motaparathi K. Bullous Pemphigoid and Other Pemphigoid Dermatoses. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 4;57(10):1061. doi: 10.3390/medicina57101061. PMID: 34684098; PMCID: PMC8539012.

Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una metodica che si basa sulla reazione antigene-anticorpo marcato, al fine di rilevare specifici antigeni bersaglio. Questa tecnica non solo è in grado di confermarci il sospetto clinico, ma costituisce anche la base su cui possono essere effettuati test di livello superiore come ELISA e immunoblotting (IB).

○ *Immunofluorescenza diretta (IFD)*

L'immunofluorescenza diretta rappresenta il gold standard diagnostico e viene effettuata utilizzando come substrato cute umana trattata con soluzione di NaCl 1M in cui si induce scissione dermo-epidermica che garantisce un'ottimale sensibilità alla rilevazione degli autoanticorpi e oltretutto permette di differenziare le specificità anticorpali.

La biopsia deve essere eseguita con punzione di 4 mm della cute o mucosa perlesionale entro un raggio di 1 cm dalla lesione stessa sia essa vescica o erosione.

In presenza di patologia alla IFD si rileva una colorazione lineare di IgG e/o C3 alla giunzione dermo-epidermica (Fig. 22) talvolta combinati con colorazione lineare debole di IgA o IgE. (105)

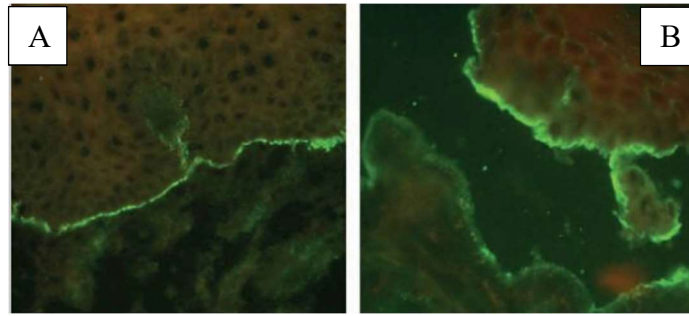


Figura 22 – Caratteristiche istopatologiche del pemfigoide bolloso A: deposizione lineare di C3 al BMZ. B: IgG legate al lato epidermico del distacco utilizzando la tecnica della pelle spaccata in sale.

Tratto da: Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019 Mar-Apr;94(2):133-146. doi: 10.1590/abd1806-4841.20199007. Epub 2019 May 9. PMID: 31090818; PMCID: PMC6486083.

○ *Immunofluorescenza indiretta (IIF)*

L'immunofluorescenza indiretta nella diagnosi del pemfigoide è un test che utilizza come substrato cute umana trattata con soluzione di NaCl 1M, che permette di ottenere la scissione dermo-epidermica per valutare le specificità anticorpali sulla base della localizzazione del legame, se alla base o se al tetto della scissione artificiale. (106)

Test sierologici di conferma

Il test ELISA (Enzyme linked immuno assay) permette di valutare la presenza di autoanticorpi circolanti anti BP180, NC16A, BP230 la cui quantificazione correla direttamente con l'attività di malattia. È noto come un alto titolo di IgG anti BP180 e NC16A al momento della sospensione della terapia con corticosteroidi è correlato ad un alto rischio di recidiva e questo aiuta nella gestione terapeutica del paziente. Gli autoanticorpi anti BP230 in genere sono valutati solo nel caso di ELISA negativo per BP180. Infine le tecniche di immunoblotting e immunoprecipitazione ad oggi sono state soppiantate dall'ELISA nella pratica clinica. (107)

Necessary criteria for the diagnosis of bullous pemphigoid

In case of the following constellations, it is recommended to make the diagnosis of bullous pemphigoid:

- ▶ Compatible clinical picture and positive direct IF microscopy and reactivity with BP180^{*} and/or BP230^{*}
- ▶ Compatible clinical picture and positive direct IF microscopy and epidermal binding of IgG in indirect IF microscopy on split skin
- ▶ Clinical picture with tense blisters and epidermal binding of IgG in indirect IF microscopy on split skin or monkey esophagus and reactivity with BP180^{*} and/or BP230^{*}
- ▶ Clinical picture with tense blisters and corresponding histopathology and epidermal binding of IgG in indirect IF microscopy on split skin
- ▶ Compatible clinical picture and corresponding histopathology (subepidermal cleavage) and reactivity with BP180^{*}
- ▶ Clinical picture with tense blisters and pronounced reactivity with BP180^{*} (e.g. > 3 times the lower detection threshold in a commercial ELISA)

^{*}in commercial assays (ELISA or indirect IF microscopy)

Figura 23 – Criteri per la diagnosi del pemfigoide bolloso.

Tratto da: Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sárdy M, Sitaru C, Eming R, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Orzechowski HD, Pfeiffer C, Schuster V, Sporbeck B, Sticherling M, Worm M, Zillikens D, Nast A. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid. J Dtsch Dermatol Ges. 2015 Jul;13(7):713-27. English, German. doi: 10.1111/ddg.12612. PMID: 26110729.

Trattamento

Gli obiettivi del trattamento sono rappresentati dal controllo della sintomatologia, della comparsa di lesioni su cute e mucose oltre che dalla ridurre al minimo eventuali effetti avversi legati al trattamento farmacologico stesso.

Il trattamento in particolare viene impostato sulla base della gravità della patologia che può essere lieve-localizzata, moderato-severa o recidivante. Nel primo caso si utilizzeranno corticosteroidi topici e sistemici associati a tetracicline; nel secondo caso corticosteroidi sistemici accompagnati da agenti risparmiatori di corticosteroidi; nel terzo e ultimo caso per esempio il Rituximab. (Fig. 24)

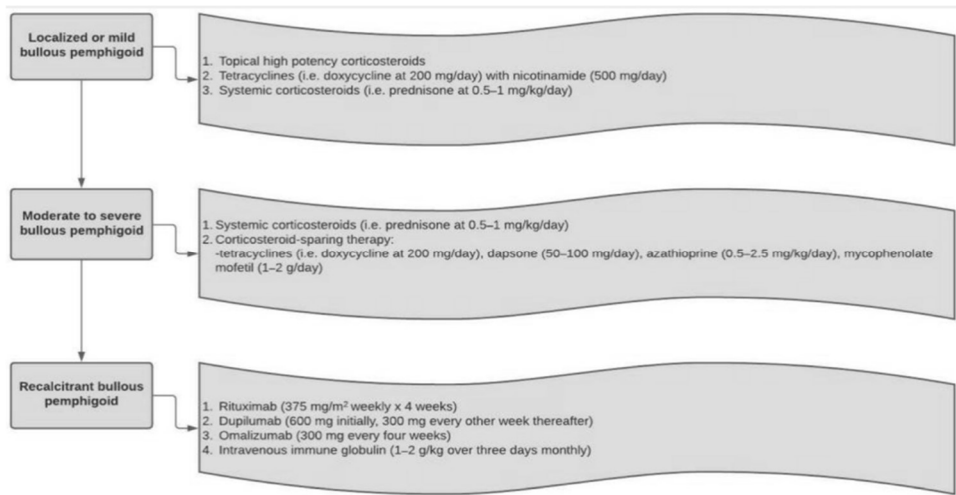


Figura 24 – Algoritmo per il trattamento del pemfigoide bolloso

Tratto da: Pratasava V, Sahni VN, Suresh A, Huang S, Are A, Hsu S, Motaparathi K. Bullous Pemphigoid and Other Pemphigoid Dermatoses. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 4;57(10):1061. doi: 10.3390/medicina57101061. PMID: 34684098; PMCID: PMC8539012.

Corticosteroidi

Il trattamento del PB si basa sull'utilizzo topico di corticosteroidi come il clobetasolo propionato allo 0.05% da applicare sulle lesioni se la malattia è localizzata. Il monitoraggio della terapia deve tenere in considerazione la comparsa ex novo di teleangectasie, atrofie e strie.

Nella forma di malattia generalizzata in passato invece si optava per impostare una terapia corticosteroidica sistemica, nonostante non siano da sottovalutare l'aumento di mortalità e morbilità negli anziani. In letteratura sono riportati degli studi in cui si è confrontata la terapia corticosteroidica topica contro terapia orale. Si è evidenziato come il trattamento topico abbia permesso di raggiungere il controllo della malattia più precocemente. Purtroppo la terapia topica ha dei punti a sfavore che sono rappresentati dalla scarsa compliance oltre che dalla necessità di evitarne l'applicazione sul viso. Se tuttavia la malattia è molto diffusa si può optare per la terapia ad assunzione orale con prednisone 0.5-1 mg/Kg/die e una volta ridotti i sintomi è possibile ridurre il dosaggio.

Nel caso di pazienti in cui non si riesca ad ottenere il controllo della malattia o ci siano delle controindicazioni alla terapia steroidea, si può optare per terapie di seconda linea.

Adiuvanti immunosoppressivi

I trattamenti di seconda linea utilizzabili in associazione agli steroidi nelle forme di pemfigoide bolloso diffuso sono gli immunosoppressori come l'azatioprina, micofenolato mofetile o ciclofosfamide. In particolare tra azatioprina e micofenolato non sono state evidenziate differenze di efficacia ma la prima si è associata ad un maggior rischio di epatotossicità contrariamente al secondo. La ciclofosfamide dal canto suo è un farmaco cancerogeno, la cui assunzione può essere responsabile di infertilità, tale per cui è utilizzato quando gli altri trattamenti immunosoppressivi più sicuri hanno fallito.

Terapie alternative

In alternativa nelle forme diffuse non responsive ai trattamenti di prima linea possono essere l'uso di farmaci biologici come le immunoglobuline per via endovenosa, plasmaferesi. Terapia ancora più recenti includono Rituximab inibitore di CD20, Omalizumab con target le IgE, Dupilumab inibitore del recettore dell'IL-4. (94)

5. HLA-CW6 e autoimmunità

Gli antigeni leucocitari umani (HLA) sono glicoproteine associate alla membrana del complesso maggiore di istocompatibilità umano (MHC). (108)

Il super-locus HLA è una regione genomica posta sul braccio corto del cromosoma 6, che a sua volta può essere suddiviso in cinque regioni HLA: le regioni di classe I, classe I estesa, classe III, classe II e classe II estesa. Le regioni HLA di classe I (A, B, C) e II (DR, DP, DQ) comprendono geni che codificano per proteine che hanno ruoli importanti nella regolazione del sistema immunitario, ovvero quella di presentare gli antigeni che vengono poi riconosciuti dal recettore clonotipico dei linfociti T. Questo riconoscimento può potenzialmente determinare la creazione di un contatto cellula-cellula stabile e quindi l'attivazione del linfocita stesso. (109)

In particolare le glicoproteine codificate dai geni HLA di tipo I sono espresse sulla superficie delle cellule nucleate, con la funzione di presentare l'antigene ai linfociti T CD8+ ed innescare di una risposta citotossica; le glicoproteine codificate invece da HLA di tipo II che si collocano superficialmente alle cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B ed hanno la funzione di attivare i linfociti CD4+ con la conseguente attivazione di una risposta umorale. (Fig. 25)

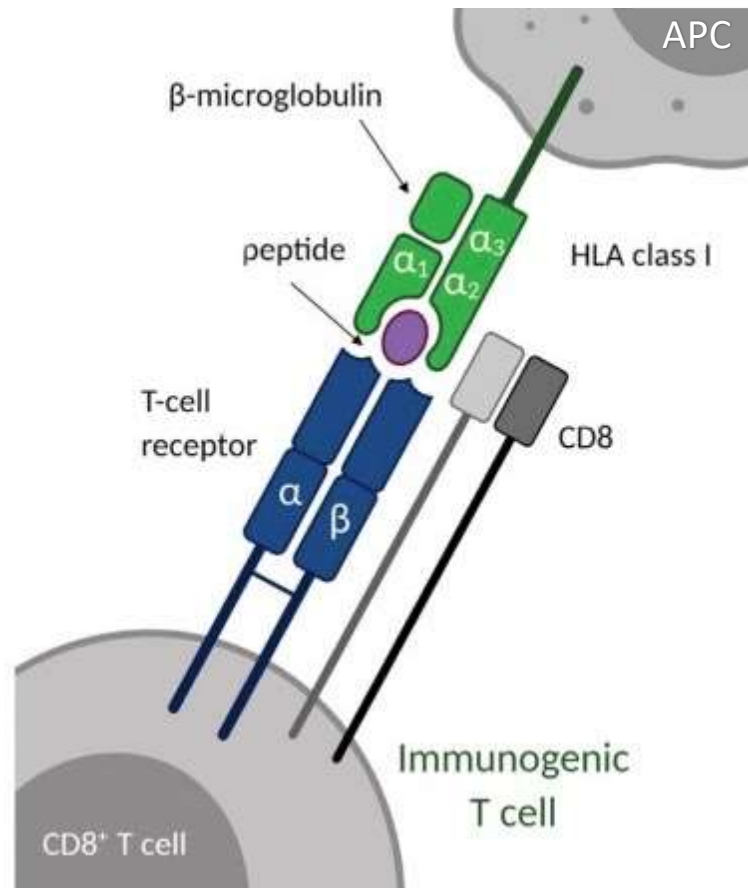


Figura 25 – Rappresentazione schematica della presentazione dell'antigene MHC I alla cellula T CD8+.

Tratto da: Augusto DG, Hollenbach JA. HLA variation and antigen presentation in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection. *Curr Opin Immunol.* 2022 Jun;76:102178. doi: 10.1016/j.coi.2022.102178. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35462277; PMCID: PMC8947957.

Dal punto di vista strutturale le glicoproteine codificate da HLA sono caratterizzate da un basamento formato da domini che sono composti, nel caso di MHC I da due catene alfa, mentre nel caso di MHC II da una catena alfa e una beta. I due domini vanno a costituire un foglietto beta, sormontato da due alfa eliciche con interposta

una catena peptidica. Tra i due domini, il legame peptidico è determinato sia dall'interazione tramite legami ad idrogeno tra la tasca del complesso e porzione dorsale peptidica, sia dall'interazione con siti di legame definiti dalle catene peptidiche laterali. (110)

Il polimorfismo HLA-CW6 è localizzato nella posizione cromosomica 6p21.3 di PSORS1 tra gli HLA di classe I (Fig. 26) ed è un allele la cui correlazione con il rischio di sviluppare patologie autoimmuni è stata ampiamente dimostrata in letteratura. Le dermatopatie immunobollose, come pemfigo e pemfigoide, presentano una patogenesi mediata dallo sviluppo di autoanticorpi e rientrano certamente tra le malattie autoimmuni, con un meccanismo di immunoreazione di tipo II. La psoriasi presenta una immunopatogenesi autoimmune che è invece di tipo cellulo-mediato, mediata da un'iperattivazione dei linfociti T. A tale riguardo HLA-CW6 è stato il primo gene HLA per cui è stata scoperta una significativa associazione alla psoriasi, al punto che tra il 20 e il 50% dei pazienti si è dimostrato esserne portatore. (111)

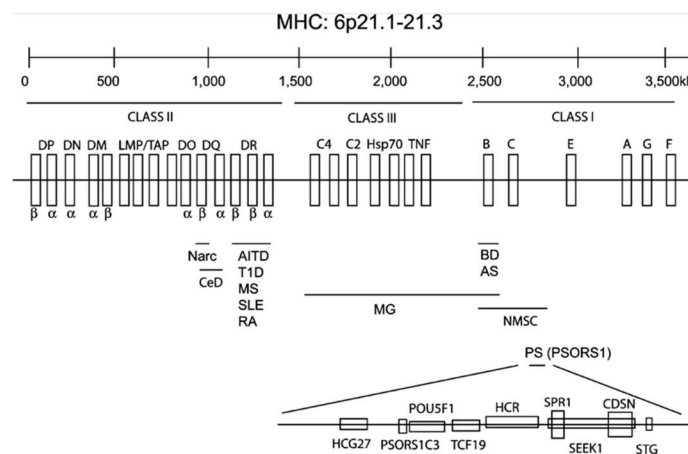


Figura 26 – Mappa del cromosoma 6p21.3 con gene PSORS1.

Tratto da: BOWCOCK, Anne M. La genetica della psoriasi e dell'autoimmunità. *Anno. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2005, 6: 93-122.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del presente studio è la valutazione dell'associazione tra la presenza del polimorfismo del gene HLA-CW6 e la suscettibilità allo sviluppo del pemfigo confrontando la frequenza osservata con la prevalenza del polimorfismo in una popolazione sana di riferimento tratta dalla letteratura.

MATERIALI E METODI

1. DISEGNO E POPOLAZIONE OGGETTO DELLO STUDIO

È stato condotto uno studio sperimentale in vitro su campioni biologici di sangue venoso per cui sono stati arruolati 40 pazienti, presentanti i seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi di pemfigo: clinicamente sospettato e poi confermata istologicamente mediante immunofluorescenza diretta
- disponibilità di un campione ematico in quantità adeguate
- consenso informato alla partecipazione allo studio
- maggiore età dei pazienti, di ambo i sessi

I criteri di esclusione sono invece i seguenti:

- diagnosi di altre malattie bollose autoimmuni diverse dal pemfigo

Il campione reclutato consta di 40 pazienti di cui 15 maschi e 25 femmine con diagnosi di pemfigo effettuata presso la Clinica Dermatologica dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Il gruppo in esame possedeva un'età compresa tra i 22 e i 95 anni, nella fattispecie 2 pazienti rientravano in un'età compresa tra i 20 e i 39 anni, 20 pazienti in un'età compresa tra i 40 e i 59 anni, 14 pazienti in un'età compresa tra i 60 e i 79 anni e infine 4 pazienti in un'età compresa tra gli 80 e i 99 anni. (Tab.1)

I pazienti appartengono al territorio della Regione Veneto e dal momento che lo studio si basa su una raccolta di dati estrapolati tramite metodo retrospettivo, per poter essere inclusi nello studio era necessario che presentassero una scheda anamnestica completa all'interno del database del programma digitale privato "Galileo" dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

La ridotta numerosità campionaria esaminata è legata alla rarità della patologia oggetto di studio e al numero di pazienti afferenti presso la clinica Dermatologica di Padova.

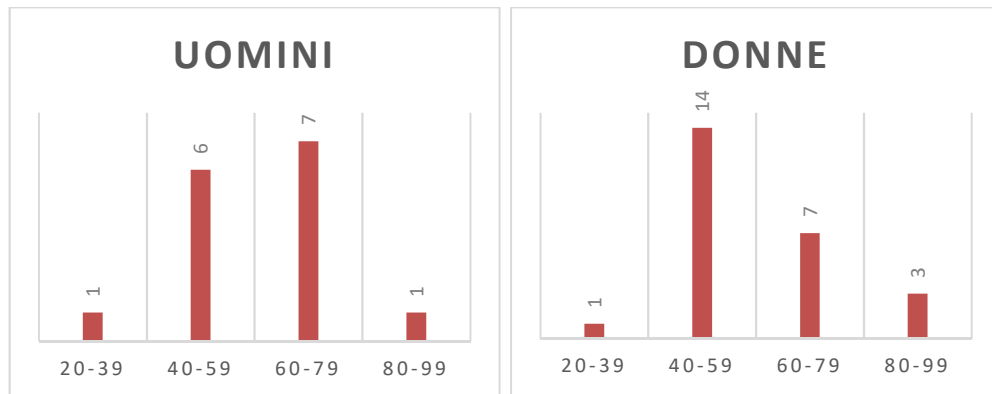


Tabella 1: Caratteristiche demografiche del campione oggetto di studio.

I campioni biologici di sangue venoso sono stati utilizzati, oltre che per le analisi oggetto di questo studio, anche per la diagnostica sierologica della patologia tramite studi di immunofluorescenza indiretta ed ELISA, che fa parte dell'inquadramento laboratoristico standard delle patologie bollose autoimmuni.

2. TECNICHE DI LABORATORIO

Per la valutazione degli alleli HLA in pazienti affetti da pemfigo sono stati eseguiti studi di biologia molecolare, a partire da campioni di sangue intero, basati su un'analisi multiparametrica tramite EUROArray. Questo ci ha permesso di valutare contemporaneamente un pannello ampio di diversi alleli per ciascun paziente nonché più pazienti simultaneamente.

L'allele genotipizzato nel nostro studio è CW*06.

In breve, l'iter di laboratorio prevede una prima fase laboratoristica e una successiva automatizzata che consistono nei seguenti passaggi:

- estrazione del DNA genomico a partire da campioni di sangue intero
- amplificazione del DNA tramite PCR multiparametrica
- ibridazione dei prodotti della PCR con EUROArray
- fase di lettura, che si avvale di una scansione automatizzata, per la valutazione dei risultati, e include la valutazione di alcune sonde di controllo per confermare la corretta esecuzione della PCR e dell'ibridazione

Si riportano di seguito i dettagli dell'iter seguito:

PRE-PCR	CREAZIONE PROTOCOLLO
1	Aprire il software e cliccare su "Nuovo protocollo"
2	Selezionare "HLA-DQ2/DQB-h Direct" e inserire lotto
3	Campioni da 1 a 4 = "Patient"
4	CONTROL in ultima posizione = "Neg. Control"
5	Salva e stampa protocollo

PRE-PCR	PREPARAZIONE 15 MINUTI PRIMA DI ESTRAZIONE
1	Rimuovere dal congelatore i rack di raffreddamento per provette e MIX e posizzarli sotto cappa
2	Rimuovere dal congelatore MIX A, B, C, D e posizzarle in frigo
3	Accendere il termociclatore e preriscaldare il coperchio

PRE-PCR	ESTRAZIONE DEL DNA
1	Scongela il controllo negativo CONTROL
2	Marcare le provette (1,5 ml) con i numeri del protocollo
3	20 µl EXT SOLUT 1
4	5 µl CAMPIONE o CONTROL
5	Miscelare /Vortexare e incubare 1 minuto
6	20 µl EXT SOLUT 2

PRE-PCR	PIPETTAMENTO CAMPIONI PCR
1	Accertarsi che le MIX A, B, C, D siano scongelate
2	Marcare le provette PCR -2 x campione- con i numeri del protocollo e posizzarle nel rack di raffreddamento

3	MASTER MIX 1 in 1,5 ml: 11 µl Mix A x campione + CONTROL + 11 µl Mix B x campione + CONTROL
	MASTER MIX 2 in 1,5 ml: 11 µl Mix C x campione + CONTROL + 11 µl Mix D x campione + CONTROL
4	20 µl MASTER MIX 1 in ciascuna provetta PCR 20 µl MASTER MIX 2 in ciascuna provetta PCR
5	Vortexare 5 secondi il DNA estratto prima di pipettare
6	5 µl DNA estratto/DNA genomico isolato
7	Sigillare tutte le provette di reazione PCR prima di caricare sul termociclatore

POST-PCR	IBRIDAZIONE con i vetrini EUROArray
1	Pre-riscaldare piattaforma 45°C x 45 minuti
2	Pre-riscaldare vetrino numerato e rovesciato su piattaforma a 45°C x 15 minuti. Coprire con coperchio
3	65 µl HYB BUFFER nel primo prodotto Mmix1. Mescolare pipettando su e giù per 3 volte. Prelevare e pipettare 65 µl di questa soluzione nel primo prodotto Mmix2. Mescolare, prelevare e pipettare 65 µl della soluzione sulla TITERPLANE e procedere così per ciascun campione
4	Adagiare il vetrino secondo tecnica TITERPLANE. Tutti i microarray vengono a contatto con le gocce e inizia l'ibridazione
5	Chiudere il coperchio e incubare a 45°C x 60 minuti
6	Preparare i tamponi di lavaggio 1, 2, 3
7	Lavare seguendo schema WASHER e asciugare con aria compressa

POST-PCR	WASH REAGENT 1	WASH REAGENT 2	WASH REAGENT 3
1	25 ml WASH REAGENT 1	1,25 ml WASH REAGENT 1	12,5 ml WASH REAGENT 1
2	400 ml dH ₂ O	200 ml dH ₂ O	237,5 ml dH ₂ O
3	5 ml WASH REAGENT 2	2,5 ml WASH REAGENT 2	
4	70 ml dH ₂ O	47 ml dH ₂ O	
	TOT 500 ml	TOT 250 ml	TOT 250 ml
	Prima immersione + 1 minuto	2 minuti	5 secondi

LAVAGGIO O/N TITERPLANE-supporto vetroso-
10 ml WASH REAGENT 2
990 ml dH ₂ O

POST-PCR	SCANSIONE E VALUTAZIONE
1	Aprire il software EUROArrayScan e accendere lo Scanner
2	Selezionare il protocollo e la voce del menù "Scansione vetrini"
3	Cliccare "Avvio" e seguire le istruzioni del programma
4	Nella pagina "Mostra" verificare che nelle immagini tutti gli spot di tutti gli array siano stati identificati correttamente e cliccare "Salva". Spegnerlo Scanner e stampare i risultati

La composizione del microarray (Tab. 2) prevede la presenza di sonde di DNA a catena singola con una lunghezza compresa tra 20 e 60 nucleotidi, immobilizzate come spot su BIOCHIP nei campi di reazione dei vetrini. Ad ogni possibile prodotto di PCR corrispondono una o più sonde sotto forma di coppie di spot sul microarray. Inoltre il microarray contiene degli spot di controllo ibridizzati con

oligonucleotidi di controllo fluorescinati che contribuiscono ad identificare eventuali errori nello svolgimento dell'analisi. Questi controlli interni sono presenti sul microarray come coppie di spot.

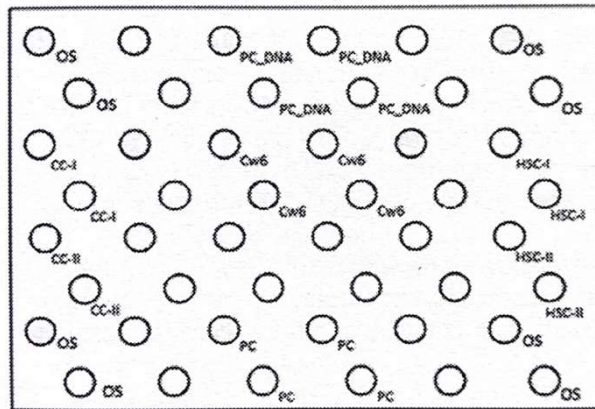
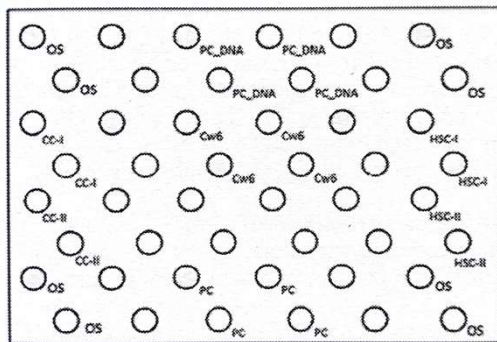


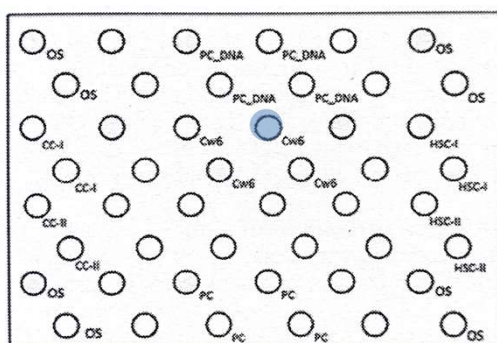
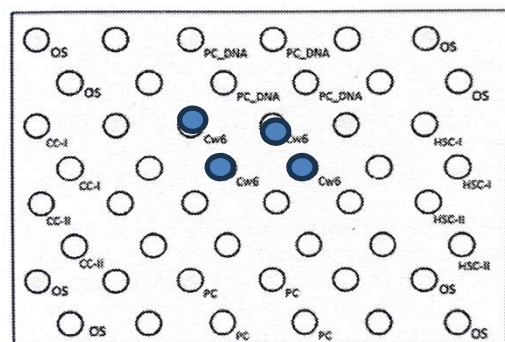
Tabella 2: Composizione del microarray. **CW6**: il probe ibridizza HLA-CW6 prodotto mediante PCR. **PC_DNA**: controllo positivo di DNA. **CC-I e CC-II**: controllo della cross contaminazione. **HSC-I e II**: controllo della specificità di ibridazione. **PC**: controllo positivo di HLA-CW6. **OS**: spot di orientamento. **Nessuna interdesignazione**: spot inutilizzati.

L'interpretazione dei risultati prevede:



HLA-CW6 negativo: il campione non presenta l'allele HLA-CW6.

HLA-CW6 positivo: il campione presenta almeno un allele HLA-CW6



HLA-CW6 non valido: le sonde alleliche non indicano chiaramente il genotipo e/o i risultati dei controlli interni o dei controlli negativi esterni sono invalidi.

3. ANALISI STATISTICA

Per poter paragonare in termini statistici il campione in esame, il quale presenta una numerosità non elevata, è stato calcolato l'intervallo di confidenza al 95% per la proporzione di soggetti con presenza del polimorfismo HLA-CW6 ed è stato eseguito il test d'ipotesi.

L'intervallo di confidenza al 95% per la proporzione di soggetti con presenza del polimorfismo HLA-CW6 è stato calcolato usando come stimatore la proporzione campionaria p degli affetti (M1):

$$\text{Frequenza allelica CW6 in M1: } p = \frac{6}{80} = 0,075$$

$$IC = p \pm 1.96 \sqrt{p(1-p)/n} = [0.017 ; 0.133]$$

Per il calcolo del test d'ipotesi è stato utilizzato un test per le proporzioni bidirezionale ad un livello di significatività fissato al 5%.

L'ipotesi nulla dello studio (H_0) prevede che l'incidenza cumulativa della presenza del polimorfismo HLA-CW6 nel campione degli affetti (M1) sia uguale all'incidenza cumulativa dello stesso nella popolazione di riferimento (M2):

- $H_0: = M1 = M2.$

L'ipotesi alternativa dello studio (H_1) prevede che l'incidenza cumulativa della presenza del polimorfismo HLA-CW6 nel campione degli affetti (M1) sia diversa dall'incidenza cumulativa dello stesso nella popolazione di riferimento (M2):

- $H_1: = M1 \neq M2.$

Per poter confrontare in maniera statisticamente significativa le due proporzioni in esame e verificare una delle due ipotesi, è stato utilizzato il test per le proporzioni o test "Z" fissando un livello di significatività statistica alfa al 5%.

$$\text{Frequenza allelica CW6 in M2: } = \pi = 0,086$$

$$\text{Frequenza allelica CW6 in M1: } p = \frac{6}{80} = 0,075$$

$$n \text{ alleli} = 80$$

$$\text{alfa} = 0.05$$

$$z = \frac{p - \pi}{\sqrt{\pi(1 - \pi)/n}} = -0.35$$

RISULTATI

L'intervallo di confidenza al 95% per la proporzione di soggetti con presenza del polimorfismo HLA-CW6 è risultato pari a [0.017 ; 0.133], che comprende il valore osservato dell'incidenza della popolazione di riferimento (M2) pari a 8.6%. Come ci si aspettava il p-value risultante dal test di ipotesi è risultato consistente al risultato dell'intervallo di confidenza con un valore pari a 0,6368. Dai risultati delle analisi statistiche non è quindi possibile rifiutare l'ipotesi di uguaglianza delle incidenze cumulative di presenza del polimorfismo HLA-CW6 nel campione degli affetti (M1) rispetto alla popolazione di riferimento (M2).

Attraverso la valutazione retrospettiva dei tre pazienti affetti risultati portatori di HLA-CW6, è stato possibile caratterizzarli sulla base di diversi parametri, al fine di mettere in evidenza eventuali peculiarità, rispetto ai restanti pazienti affetti da pemfigo ma non portatori del polimorfismo.

Paziente	Sesso	Età	Età diagnosi		Localizzazione		Comorbidità	Terapia
					Cute	Mucose		
1	F	45	40	SI	SI	/	RIT	
2	F	70	66	NO	SI	DM2, Dislipidemia	CS	
3	F	56	53	SI	SI	Ipertensione	CS	

Tabella 3: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti portatori dell'allele HLA-CW6.

Paziente	Sesso	Età	Età diagnosi	Localizzazione		Comorbidità	Terapia
				Cute	Mucose		
4	M	51	45	SI	SI		RIT
5	F	93	89		SI	/	/
6	F	95	/	/	/	Demenza vascolare	/
7	M	53	47	SI	SI	Dissezione spontanea carotidi interne	RIT
8	M	72	64	SI	SI	Gammopatia monoclonale MGUS IgG/k	RIT
9	F	38	29		SI		RIT
10	F	46	40	SI	SI		RIT
11	M	71	61		SI	Tiroidite autoimmune	RIT
12	M	77	70	SI		Gozzo multinodulare, IPB, osteopenia	RIT
13	M	47	/	/	/	/	/
14	M	56	50	SI	SI		RIT
15	F	59	56	SI	SI		AZA
16	F	48	45	SI	SI		RIT
17	F	49	40		SI		CS
18	F	52	/	/	/	/	/
19	F	74	71	SI		DM2	CS
20	M	77	/	/	/	/	/
21	F	77	73	SI	SI		CS
22	F	47	45		SI		CS
23	F	59	47		SI		RIT

24	M	22	20	SI			RIT
25	F	61	58	SI	SI		RIT
26	M	61	57		SI		CS
27	F	74	67	SI	SI		RIT
28	F	57	50		SI		CS
29	F	70	68	SI		Tachicardia sinuale	CS
30	F	80	76		SI		CS
31	F	54	50	SI	SI		CS
32	M	83	/	/	/	/	/
33	F	50	/	/	/	/	/
34	M	62	/	/	/	/	/
35	M	53	50	SI	SI		RIT
36	F	60	50	SI	SI		CS
37	F	51	50	SI			AZA
38	F	41	40	SI			CS
39	M	50	48	SI	SI	Melanoma del dorso	RIT
40	M	68	59	SI		Iperensione, epilessia, ipercolesterolemia, gota	AZA

Tabella 4: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti non portatori dell'allele HLA-CW6.

DISCUSSIONE

Il polimorfismo HLA-CW6 è fondamentale per l'attivazione della risposta immunitaria nello sviluppo delle patologie autoimmuni in ragione della sua funzione di presentazione antigenica. È noto come la sua presenza correli con un maggiore rischio di sviluppare patologie autoimmuni. Tra le patologie croniche infiammatorie immuno-mediate di pertinenza dermatologica, la psoriasi è quella per cui è riconosciuto in letteratura il legame più forte con tale polimorfismo. La psoriasi rientra nello spettro dell'autoimmunità perché la sua patogenesi è mediata da un'iperattivazione dei linfociti T nei confronti di auto-antigeni, quali i peptidi antimicrobici (in primo luogo LL37) che sono in grado di interagire con il DNA self che può essere esposto in seguito al danno dei cheratinociti.

In letteratura infatti sono riportati numerosi studi in cui è stata comprovata l'associazione tra la positività per l'allele HLA-CW6 e la psoriasi, in particolare con forme a precoce insorgenza.

Sebbene classicamente le malattie bollose autoimmuni cutanee siano considerate patologie anticorpo mediate, è noto ad oggi anche il ruolo della risposta cellulomediata nella patogenesi delle stesse. Sulla base di questi potenziali meccanismi condivisi tra psoriasi e dermopatie immunobollose, è nato il razionale dello studio che ha come obiettivo quello di utilizzare questo nesso tra le due patologie, per ricercare anche nelle malattie bollose autoimmuni un'eventuale correlazione con l'allele HLA-CW6.

- *Risposta cellulomediata*

Le prove a sostegno del fatto che la produzione anticorpale nel pemfigo sia T-cellula-dipendente sono date da diverse evidenze: l'alta affinità antigenica delle immunoglobuline IgG ottenute dopo commutazione isotipica, il riconoscimento di diversi epitopi sulle desmogleine, l'associazione tra autoanticorpi e specifici alleli HLA II (ad esempio DRB1*0402, DRB1*1401 e DQB1*0302 nei caucasici). È stata dimostrata anche la presenza di linfociti autoreattivi contro Dsg3 sia in pazienti affetti che sani. (112) Infine alcuni peptidi di Dsg3, previsti per inserirsi nella tasca di DRB1*0402, sono stati in grado di stimolare le cellule T dei pazienti affetti da pemfigo. E' prevista l'effettuazione di uno studio in vivo su

modelli murini di pemfigo volgare, per permettere l'acquisizione di nuove conoscenze in merito alle strategie terapeutiche e ai meccanismi che sottintendono la comparsa della malattia. (113)

L'associazione tra psoriasi e malattie immunobollose è stata studiata in condizioni di pertinenza dermatologica di seguito approfondite:

- *Psoriasi e pemfigo*

La maggior parte dei casi di pemfigo associati a psoriasi riguardano il pemfigo foliaceo e l'eritematoso. In merito a questo è stato condotto uno studio da Ohata C. et al. che ha cercato di caratterizzare i pazienti affetti da pemfigo e psoriasi, facendo emergere come l'unica forma presente nei quattro casi di pemfigo, fosse il pemfigo foliaceo (2.8%). (114)

Lo studio caso-controllo effettuato da Tsai TF. et al. su 51.000 pazienti affetti da psoriasi a Taiwan ha rivelato come i pazienti affetti da psoriasi siano effettivamente maggiormente soggetti allo sviluppo di pemfigo rispetto ai controlli (odds ratio (OR), 41,8; 95% intervallo di confidenza (CI), 12,4-140,9; $P < 0,0001$). (115)

Allo stesso modo in letteratura è riportato uno studio caso-controllo su 1985 pazienti Israeliani che invece valuta la relazione opposta, ovvero la prevalenza, nei pazienti affetti da pemfigo, della malattia psoriasica. Kridin K. et al. hanno quindi messo in evidenza come la prevalenza nei casi sia superiore ai controlli (OR, 2,84; 95% CI, 2,09-3,85, $P < 0,001$). (116)

- *Psoriasi e pemfigoide*

L'evoluzione della malattia psoriasica con comparsa di pemfigoide è molto più frequente rispetto al pemfigo, anche se il differenziale nel numero di segnalazioni è solo tre volte superiore nel primo caso. In uno studio eseguito in Giappone su 145 pazienti affetti da psoriasi e malattie bollose autoimmuni, si è osservato come quasi la totalità sia complicata da pemfigoide bolloso (63%), pemfigoide anti lamina $\gamma 1$ (precedentemente pemfigoide anti-p200) (37%) o la loro combinazione (8%). La psoriasi,

inclusa la psoriasi pustolosa che possiamo classificare tra le patologie neutrofiliche, nella maggior parte dei casi precede lo sviluppo del pemfigoide. Da notare che 111 (78,7%) casi non avevano una storia di fototerapie in questa serie di casi. (114)

Uno studio condotto da Tsai TF. Et al. su 51.800 pazienti ha messo in evidenza come il tasso di prevalenza del pemfigoide sia maggiore rispetto ai controlli (OR, 14,8; 95% CI, 5,00–43,50, $P < 0,0001$). (115)

Differentemente uno studio caso-controllo condotto da Kridin K. Et al. ha dimostrato come l'11% dei casi di pemfigoide vanno incontro a sviluppo di psoriasi e la prevalenza è più alta rispetto a quanto previsto nei controlli. Allo stesso modo anche altri due studi hanno confermato che la psoriasi sia significativamente associata al pemfigoide bolloso: il primo eseguito da Chen Y. J. su 3.485 pazienti affetti da pemfigoide bolloso a Taiwan OR 2.02; IC 95% 1.54–2.66, $P < 0.003$) (117) e l'altro eseguito in Israele da Kridin K. Et al su 287 pazienti affetti da pemfigoide bolloso (OR 4,39; 95% CI 2,17–8,92, $P < 0,0001$). (116)

Esiste una forma di pemfigoide a sviluppo in pazienti affetti da psoriasi caratterizzati dalla presenza di autoanticorpi circolanti contro antigeni sconosciuti, denominato pemfigoide anti laminina $\gamma 1$ che in uno studio eseguito da Dainichi T et al. si è rivelato essere correlato a psoriasi in un terzo dei casi esaminati. (118)

Un ultimo studio che ha valutato l'associazione tra malattie pemfigoidi e psoriasi condotto da Ohata C. et al. su 145 pazienti in Giappone ha fatto emergere come ci fossero due casi di epidermolisi bollosa acquisita e tre casi di dermatosi bollosa da IgA. (114) Sempre nel contesto dell'epidermolisi bollosa in un altro studio di Hoshina D. et al. viene riportato un caso di epidermolisi bollosa acquisita associata a psoriasi volgare tendenzialmente a tipologia infiammatoria. (119) Un ulteriore studio eseguito da Ohashi M et al. riporta il solo caso segnalato in letteratura di un uomo giapponese affetto da psoriasi e pemfigoide della membrana mucosa anti-laminina 332, dimostrando l'estrema rarità di questa condizione. (120)

L'allele HLA-CW6 è stato studiato in condizioni di pertinenza dermatologica diverse dal pemfigo, di seguito approfondite:

- *HLA-CW6 e clinica della psoriasi*

L'associazione tra l'allele HLA-CW6 e psoriasi è stata resa nota con uno studio condotto da Henseler T. et al. effettuato su 2147 pazienti affetti da psoriasi in cui si è valutato decorso clinico ed età di insorgenza. In merito all'età di esordio, dallo studio è si sono riscontrati due picchi di incidenza, che rispettivamente per femmine e maschi sono stati: il primo a 16 e 22 anni e il secondo a 60 e 57 anni, denominati rispettivamente early e late onset. In particolare nei pazienti ad esordio precoce, la tipizzazione di HLA-CW6 ha rivelato come l'85.3% dei pazienti fosse positivo. Differentemente esso era presente solo nel 14.7% dei pazienti con late onset. (122)

È stato possibile affermare dunque che la positività ad HLA-CW6 si associ ad un quadro di psoriasi di tipo I a comparsa precoce prima dei 40 anni, lesioni cutanee diffuse e anamnesi familiare positiva. In questo caso i fattori scatenanti sono rappresentati da faringiti o tonsilliti streptococciche oltre che da stress. Differentemente la psoriasi di tipo II si manifesta invece dopo i 40 anni in cui altre comorbidità o terapie farmacologiche agiscono da trigger per lo sviluppo della condizione patologica. (123)

L'associazione tra allele HLA-CW6 con le manifestazioni cliniche dei pazienti affetti da psoriasi, in uno studio condotto da Gudjonsson J.E., ha fatto emergere come i pazienti risultati positivi alla tipizzazione siano caratterizzati da placche psoriasiche estese e frequente fenomeno di Koebner, al contrario delle alterazioni ungueali e del coinvolgimento del cuoio capelluto, che si sono riscontrati maggiormente in soggetti HLA-CW6-. (124)

Inoltre in uno studio di condotto da Gulliver W.P. et al nella popolazione fondatrice di Terranova e Labrador dove si è riscontrato nei pazienti HLA-CW6+ un tasso di ospedalizzazione significativamente più alto per

neoplasie, mentre nei pazienti HLA-CW6- un tasso di ospedalizzazione più alto per malattia del sistema circolatorio. (125)

In uno studio di Mallon E. et al. è emerso come HLA-CW6 sia associato anche alla psoriasi guttata caratterizzata dalla comparsa di lesioni su arti e tronco associate a fenomeno di Koebner. (126) In particolare per kobnerizzazione si intende lo sviluppo di nuove lesioni psoriasiformi in corrispondenza di traumi cutanei. (127)

La positività per HLA-CW6 si è vista essere correlata anche ad un maggior rischio di lesioni ungueali e artrite psoriasica (PsA) ad insorgenza contestuale ad un quadro di psoriasi di tipo I. Questo è stato dimostrato in un studio Szczerkowska Dobosz A. et al. in cui si è valutata la frequenza degli alleli del locus di HLA-C nei pazienti con artrite psoriasica oltre che nei controlli sani e la si è confrontata con l'età di insorgenza della psoriasi. L'aplotipo CW6 si è osservato più di frequente nei pazienti con artrite psoriasica rispetto ai controlli, inoltre nei pazienti risultati positivi alla tipizzazione è stata confermata anche un'insorgenza più precoce dell'artrite psoriasica, oltre che della psoriasi stessa. Possiamo quindi affermare che HLA-CW6 determini non solo l'aumentata suscettibilità allo sviluppo di psoriasi ma anche di PsA. (128)

-HLA-CW6 e altre comorbidità

In uno studio effettuato da Shlyankevich J. è stato evidenziato come la psoriasi si associ alla presenza di placche aterosclerotiche e questo è stato confermato dalla presenza di meccanismi patogenetici condivisi, coinvolgenti neutrofili e linfociti T. (129) Questo aspetto è ulteriormente confermato anche da un altro studio di Eder L. et al. in cui nei pazienti HLA-CW6+ si è riscontrato un maggior carico aterosclerotico in correlazione con un più alto grado di infiammazione sistemica. (130)

Per quanto riguarda la celiachia attraverso uno studio condotto da Singh S. et al. è stato osservato come nei pazienti affetti da psoriasi il rischio di sviluppo di celiachia risulta aumentato, anche se si conclude che HLA-CW6

non ha alcuna associazione con l'espressione degli anticorpi specifici nei pazienti con psoriasi. (131)

L'evidenza della correlazione tra HLA-CW6 e l'infezione da HIV-1 risale al 1998 grazie alla scoperta di Mallon. (132) Successivamente Chen H. et al. hanno messo in risalto come HLA-CW6 sia presente nell'80% dei pazienti con HIV-1 che sviluppano psoriasi, mentre solo nel 24.5% dei sieropositivi senza psoriasi. È stato evidenziato anche come l'essere portatori positivi per l'allele HLA-CW6 sia in grado di modulare l'interazione HLA-peptide virale con conseguente controllo dell'infezione. (133)

E' stata dimostrata anche una correlazione con l'obesità nei pazienti che alla tipizzazione sono risultati positivi ad HLA-CW6, presumibilmente in relazione ad una cronica infiammazione sistemica che di per se' aumenta il rischio di sviluppo di psoriasi. In particolare questo è stato comprovato in uno studio condotto da Jin Y. et al. con l'obiettivo di valutare l'effetto combinato di HLA-Cw6, BMI e rapporto vita-fianchi sulla psoriasi vulgaris. (134)

-HLA-CW6 e trattamento

Per quanto riguarda l'approccio terapeutico nei pazienti HLA-CW6, in uno studio condotto da West J. Et al. si è valutata la relazione tra genetica dell'allele HLA-CW6 con il trattamento sistemico di prima linea comunemente usato nella psoriasi, il metotrexato. Si è osservata una migliore risposta soprattutto nella corte di pazienti HLA-CW6+ che non presentavano concomitante artrite psoriasica e minori effetti avversi limitanti il trattamento (135)

Sempre nel contesto del trattamento si riporta uno studio retrospettivo condotto da Li K. Et al. che ha valutato la risposta terapeutica ad Ustekinumab in pazienti con psoriasi da moderata a grave HLA-CW6+. In questo caso è emerso come una percentuale leggermente più alta di pazienti HLA-CW6+, rispetto ai negativi, ha ottenuto risultati PASI 75/90 alle settimane 12 e 24. Una diversa risposta ad Ustekinumab è stata dunque

osservata, tuttavia con una differenza modesta rispetto ai pazienti negativi alla tipizzazione, soprattutto nelle soglie dei tassi di risposta più elevate (PASI 90/100) e nei periodi temporali più lunghi (settimane 24/28). (136)

CONCLUSIONI E LIMITI

In conclusione, i nostri risultati hanno evidenziato una frequenza dell'allele HLA-CW6 pari a 7.5% nel campione esaminato di pazienti affetti da pemfigo che però non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa rispetto alla prevalenza riportata in letteratura per una popolazione italiana.

Le limitazioni principali del nostro studio sono la ridotta numerosità campionaria, che dipende dalla rarità della patologia, e l'assenza di un campione di controllo adeguato, per cui è stato necessario confrontare la frequenza osservata del polimorfismo con la prevalenza riportata nella letteratura. Infine, il disegno retrospettivo dello studio presenta delle limitazioni legate alla raccolta anamnestica dei dati clinici e terapeutici, che non ha permesso di ricavare dati omogenei per tutti i pazienti utili a valutare la risposta alla terapia e la storia naturale della patologia.

I polimorfismi nei geni associati alla presentazione antigenica sono di interesse scientifico, in quanto possono predire il rischio di sviluppare patologie autoimmuni, e hanno soprattutto un importante risvolto clinico perché sono potenziali fattori predittivi di risposta terapeutica: questo è stato dimostrato nella psoriasi per quanto riguarda il trattamento con farmaci biologici e potrebbe diventare rilevante nel prossimo futuro anche per altre condizioni autoimmuni, quali le malattie immunobollose. Tuttavia, i risultati di questa esperienza iniziale non hanno permesso di evidenziare una associazione: pertanto, sebbene sia auspicabile estendere queste analisi ad un campione più numeroso da confrontare con un gruppo di controllo omogeneo composto da soggetti sani provenienti dalla stessa area geografica, sarà necessario considerare una potenziale associazione di altri alleli HLA con il pemfigo.

BIBLIOGRAFIA

1. Patel F, Wilken R, Patel FB, Sultani H, Bustos I, Duong C, et al. Pathophysiology of Autoimmune Bullous Diseases: Nature Versus Nurture. *Indian J Dermatol* [Internet]. 2017 [citato 14 giugno 2023];62(3):262–7. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5448260/>
2. Egami S, Yamagami J, Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol*. aprile 2020;145(4):1031–47.
3. Saschenbrecker S, Karl I, Komorowski L, Probst C, Dährnich C, Fechner K, et al. Serological Diagnosis of Autoimmune Bullous Skin Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 20 agosto 2019 [citato 14 giugno 2023];10:1974. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6736620/>
4. van Beek N, Zillikens D, Schmidt E. Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. settembre 2018;16(9):1077–91.
5. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. maggio 2018;24(2):165–74.
6. Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23 agosto 2011;12(9):565–80.
7. Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol*. luglio 2008;130(1):1–20.
8. Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. novembre 2007;127(11):2516–24.

9. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* aprile 2001;2(4):285–93.
10. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* aprile 2006;16(4):181–8.
11. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 19 ottobre 1998;143(2):391–401.
12. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 6 novembre 1998;273(45):29745–53.
13. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol.* novembre 1977;75(2 Pt 1):464–74.
14. Koch PJ, Franke WW. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* ottobre 1994;6(5):682–7.
15. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci.* aprile 2000;113 (Pt 8):1319–34.
16. Hatsell S, Cowin P. Deconstructing desmoplakin. *Nat Cell Biol.* dicembre 2001;3(12):E270-272.
17. Getsios S, Huen AC, Green KJ. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* aprile 2004;5(4):271–81.
18. Sumigray KD, Lechler T. Cell Adhesion in Epidermal Development and Barrier Formation. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2015 [citato 23 aprile 2023];112:383–414. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4737682/>

19. Cirillo N, Prime SS. Desmosomal interactome in keratinocytes: a systems biology approach leading to an understanding of the pathogenesis of skin disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. novembre 2009;66(21):3517–33.
20. Garrod D, Kimura TE. Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochem Soc Trans*. aprile 2008;36(Pt 2):195–201.
21. Cirillo N, Lanza A, Prime SS. Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC. *Exp Cell Res*. 15 febbraio 2010;316(4):580–92.
22. Aumailley M, Has C, Tunggal L, Bruckner-Tuderman L. Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 13 ottobre 2006;8(24):1–21.
23. Newton VL, Bradley RS, Seroul P, Cherel M, Griffiths CEM, Rawlings AV, et al. Novel approaches to characterize age-related remodelling of the dermal-epidermal junction in 2D, 3D and in vivo. *Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI*. maggio 2017;23(2):131–48.
24. Yurchenco PD, O’Rear JJ. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 1 ottobre 1994 [citato 30 aprile 2023];6(5):674–81. Disponibile su: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0955067494900930>
25. Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE. Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. giugno 1998;20(6):488–94.
26. P J, N L. Pemphigus group (*vulgaris*, *vegetans*, *foliaceus*, *herpetiformis*, *brasiliensis*). *Clin Dermatol* [Internet]. agosto 2011 [citato 1 maggio 2023];29(4). Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21679871/>

27. Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, et al. Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med*. 20 dicembre 1990;323(25):1729–35.
28. Nguyen VT, Ndoye A, Bassler KD, Shultz LD, Shields MC, Ruben BS, et al. Classification, clinical manifestations, and immunopathological mechanisms of the epithelial variant of paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome: a reappraisal of paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol*. febbraio 2001;137(2):193–206.
29. Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Chorzelska J. Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. *Int J Dermatol*. giugno 1975;14(5):353–9.
30. Kuan YZ, Chiou HT, Chang HC, Chan HL, Kuo TT. Intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis. *J Am Acad Dermatol*. maggio 1990;22(5 Pt 2):917–9.
31. Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, Posner LN. Pemphigus vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex, and initial lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. settembre 1974;38(3):382–7.
32. Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res*. aprile 2018;66(2):255–70.
33. Bystryn JC, Steinman NM. The Adjuvant Therapy of Pemphigus: An Update. *Arch Dermatol* [Internet]. 1 febbraio 1996 [citato 22 maggio 2023];132(2):203–12. Disponibile su: <https://doi.org/10.1001/archderm.1996.03890260105016>
34. Huang YHuei, Kuo CFu, Chen YHua, Yang YWen. Incidence, Mortality, and Causes of Death of Patients with Pemphigus in Taiwan: A Nationwide Population-Based Study. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1 gennaio 2012 [citato 22 maggio 2023];132(1):92–7. Disponibile su: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15354415>

35. Didona D, Maglie R, Eming R, Hertl M. Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies. *Front Immunol* [Internet]. 25 giugno 2019 [citato 1 maggio 2023];10:1418. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6603181/>
36. Kridin K, Zelber-Sagi S, Bergman R. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: differences in epidemiology and mortality. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(9):1095–9.
37. Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, et al. Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. ottobre 1990 [citato 17 giugno 2023];87(19):7658–62. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC54807/>
38. Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, et al. Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol*. luglio 1999;113(1):107–10.
39. Ruocco V, De Angelis E, Lombardi ML. Drug-induced pemphigus. II. Pathomechanisms and experimental investigations. *Clin Dermatol* [Internet]. 1 ottobre 1993 [citato 17 giugno 2023];11(4):507–13. Disponibile su: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0738081X93901589>
40. Tufano MA, Baroni A, Buommino E, Ruocco E, Lombardi ML, Ruocco V. Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol*. dicembre 1999;141(6):1033–9.
41. Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R. Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies. *Clin Dermatol* [Internet]. 1 luglio 2013 [citato 17 giugno

2023];31(4):374–81.

Disponibile

su:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X13000059>

42. Robbins AC, Lazarova Z, Janson MM, Fairley JA. Pemphigus vulgaris presenting in a radiation portal. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1 maggio 2007 [citato 17 giugno 2023];56(5, Supplement):S82–5. Disponibile su: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962206038977>

43. Parameswaran A, Attwood K, Sato R, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Identification of a new disease cluster of pemphigus vulgaris with autoimmune thyroid disease, rheumatoid arthritis and type I diabetes. *Br J Dermatol*. marzo 2015;172(3):729–38.

44. Chiu YW, Chen YD, Hua TC, Wu CH, Liu HN, Chang YT. Comorbid autoimmune diseases in patients with pemphigus: a nationwide case-control study in Taiwan. *Eur J Dermatol EJD*. 1 agosto 2017;27(4):375–81.

45. Kridin K, Comaneshter D, Cohen AD. Short article: Crohn’s disease and pemphigus: is there an association?: a population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. luglio 2018;30(7):727–9.

46. Kridin K, Kridin M, Shalom G, Cohen AD. The coexistence of pemphigus and psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Immunol Res*. febbraio 2019;67(1):134–41.

47. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Cohen AD. Coexistent Solid Malignancies in Pemphigus: A Population-Based Study. *JAMA Dermatol*. 1 aprile 2018;154(4):435–40.

48. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Batat E, Cohen AD. Pemphigus and hematologic malignancies: A population-based study of 11,859 patients. *J Am Acad Dermatol*. giugno 2018;78(6):1084-1089.e1.

49. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Cohen AD. Bipolar Disorder

Associated with Another Autoimmune Disease-Pemphigus: A Population-based Study. *Can J Psychiatry Rev Can Psychiatr*. luglio 2018;63(7):474–80.

50. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Cohen AD. Association between schizophrenia and an autoimmune bullous skin disease-pemphigus: a population-based large-scale study. *Epidemiol Psychiatr Sci*. aprile 2019;28(2):191–8.

51. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Cohen AD. Association Between Pemphigus and Neurologic Diseases. *JAMA Dermatol* [Internet]. marzo 2018 [citato 21 maggio 2023];154(3):281–5. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885812/>

52. Wohl Y, Dreier J, Cohen AD. Pemphigus and osteoporosis: a case-control study. *Arch Dermatol*. ottobre 2010;146(10):1126–31.

53. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primer* [Internet]. 11 maggio 2017 [citato 16 giugno 2023];3:17026. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5901732/>

54. Mavropoulos A, Orfanidou T, Liaskos C, Smyk DS, Spyrou V, Sakkas LI, et al. p38 MAPK Signaling in Pemphigus: Implications for Skin Autoimmunity. *Autoimmune Dis* [Internet]. 2013 [citato 17 giugno 2023];2013:728529. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722958/>

55. Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 agosto 2006;103(34):12855–60.

56. Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci*. giugno 1999;20(2):92–102.

57. Amber KT, Staropoli P, Shiman MI, Elgart GW, Hertl M. Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* [Internet].

2013 [citato 12 giugno 2023];22(11):699–704. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/exd.12229>

58. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. ottobre 2011;9(10):844–56; quiz 857.

59. Kilic A. Pemphigus: Subtypes, Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. In: *Autoimmune Bullous Diseases* [Internet]. IntechOpen; 2017 [citato 12 giugno 2023]. Disponibile su: <https://www.intechopen.com/chapters/57959>

60. Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sárdy M, Sitaru C, Eming R, et al. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. luglio 2015;13(7):713–27.

61. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. novembre 2011;9(11):927–47.

62. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. dicembre 2001;45(6):803–22; quiz 822–4.

63. Hoffmann K, Hertl M, Sitaru C. [Molecular diagnosis of autoimmune dermatoses]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb*. gennaio 2016;67(1):33–9.

64. Arbache ST, Nogueira TG, Delgado L, Miyamoto D, Aoki V. Immunofluorescence testing in the diagnosis of autoimmune blistering diseases: overview of 10-year experience. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2014 [citato 4 maggio 2023];89(6):885–9. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4230656/>

65. Porro AM, Seque CA, Ferreira MCC, Enokihara MMS e S. Pemphigus

vulgaris. *An Bras Dermatol* [Internet]. giugno 2019 [citato 4 maggio 2023];94(3):264. Disponibile su:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6668932/>

66. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 agosto 1997;159(4):2010–7.

67. 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*. novembre 2005;46(4):239–41.

68. Barnes PJ. Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol*. 8 marzo 2006;533(1–3):2–14.

69. Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S, et al. Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment--guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. marzo 2015;29(3):405–14.

70. Mentink LF, Mackenzie MW, Tóth GG, Laseur M, Lambert FPG, Veeger NJGM, et al. Randomized controlled trial of adjuvant oral dexamethasone pulse therapy in pemphigus vulgaris: PEMPULS trial. *Arch Dermatol*. maggio 2006;142(5):570–6.

71. Kridin K. Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:757–78.

72. Meggitt SJ, Anstey AV, Mohd Mustapa MF, Reynolds NJ, Wakelin S. British Association of Dermatologists' guidelines for the safe and effective prescribing of azathioprine 2011. *Br J Dermatol*. ottobre 2011;165(4):711–34.

73. Tavakolpour S. Current and future treatment options for pemphigus: Is it time to move towards more effective treatments? *Int Immunopharmacol* [Internet]. 1 dicembre 2017 [citato 7 maggio 2023];53:133–42. Disponibile su: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576917304058>
74. Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazhooh M, Valikhani M, Balighi K, Hallaji Z, et al. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. ottobre 2007;57(4):622–8.
75. Chams-Davatchi C, Mortazavizadeh A, Daneshpazhooh M, Davatchi F, Balighi K, Esmaili N, et al. Randomized double blind trial of prednisolone and azathioprine, vs. prednisolone and placebo, in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. ottobre 2013;27(10):1285–92.
76. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005;14 Suppl 1:s2-8.
77. Nousari HC, Sragovich A, Kimyai-Asadi A, Orlinsky D, Anhalt GJ. Mycophenolate mofetil in autoimmune and inflammatory skin disorders. *J Am Acad Dermatol*. febbraio 1999;40(2 Pt 1):265–8.
78. Meurer M. Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clin Dermatol*. 2012;30(1):78–83.
79. Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol*. agosto 2010;130(8):2041–8.
80. Schmidt E, Goebeler M, Zillikens D. Rituximab in severe pemphigus. *Ann N Y Acad Sci*. settembre 2009;1173:683–91.
81. Colliou N, Picard D, Caillot F, Calbo S, Le Corre S, Lim A, et al. Long-

term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Sci Transl Med.* 6 marzo 2013;5(175):175ra30.

82. Amber KT, Maglie R, Solimani F, Eming R, Hertl M. Targeted Therapies for Autoimmune Bullous Diseases: Current Status. *Drugs.* ottobre 2018;78(15):1527–48.

83. Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019;94(2):133–46.

84. Intong LRA, Murrell DF. Pemphigoid gestationis: pathogenesis and clinical features. *Dermatol Clin.* luglio 2011;29(3):447–52, ix.

85. Anhalt GJ, Morrison LH. Bullous and cicatricial pemphigoid. *J Autoimmun.* febbraio 1991;4(1):17–35.

86. Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, et al. Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol.* gennaio 2006;154(1):90–8.

87. Thorne JE, Anhalt GJ, Jabs DA. Mucous membrane pemphigoid and pseudopemphigoid. *Ophthalmology.* gennaio 2004;111(1):45–52.

88. Venning VA. Linear IgA disease: clinical presentation, diagnosis, and pathogenesis. *Dermatol Clin.* luglio 2011;29(3):453–8, ix.

89. Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, et al. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun.* novembre 2000;15(3):293–300.

90. Kim JH, Kim SC. Epidermolysis bullosa acquisita. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. ottobre 2013;27(10):1204–13.
91. Hofmann SC, Juratli HA, Eming R. Bullous autoimmune dermatoses. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. novembre 2018;16(11):1339–58.
92. Kridin K, Ludwig RJ. The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations. *Front Med [Internet]*. 20 agosto 2018 [citato 16 maggio 2023];5:220. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6109638/>
93. Beutner EH, Rhodes EL, Holborow EJ. Autoimmunity in chronic bullous skin diseases. Immunofluorescent demonstration of three types of antibodies to skin in sera of patients with pemphigus, bullous pemphigoid and in other human sera. *Clin Exp Immunol*. marzo 1967;2(2):141–51.
94. Pratasava V, Sahni VN, Suresh A, Huang S, Are A, Hsu S, et al. Bullous Pemphigoid and Other Pemphigoid Dermatoses. *Medicina (Mex) [Internet]*. 4 ottobre 2021 [citato 17 maggio 2023];57(10):1061. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8539012/>
95. Zhou XP, Liu B, Xu Q, Yang Y, He CX, Zuo YG, et al. Serum levels of immunoglobulins G1 and G4 targeting the non-collagenous 16A domain of BP180 reflect bullous pemphigoid activity and predict bad prognosis. *J Dermatol*. febbraio 2016;43(2):141–8.
96. Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol*. ottobre 2007;33(1–2):67–77.
97. Messingham KN, Crowe TP, Fairley JA. The Intersection of IgE Autoantibodies and Eosinophilia in the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 2019;10:2331.
98. Yan T, Zhang Z. Adaptive and innate immune pathogenesis of bullous

pemphigoid: A review. *Front Immunol* [Internet]. 10 marzo 2023 [citato 13 giugno 2023];14:1144429. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10041874/>

99. Di Zenzo G, Della Torre R, Zambruno G, Borradori L. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. *Clin Dermatol*. 2012;30(1):3–16.

100. Washio K, Nakamura A, Fukuda S, Hashimoto T, Horikawa T. A Case of Lichen Planus Pemphigoides Successfully Treated with a Combination of Cyclosporine A and Prednisolone. *Case Rep Dermatol* [Internet]. 20 marzo 2013 [citato 20 maggio 2023];5(1):84–7. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617966/>

101. Lamberts A, Meijer JM, Jonkman MF. Nonbullous pemphigoid: A systematic review. *J Am Acad Dermatol*. maggio 2018;78(5):989-995.e2.

102. Miyamoto D, Batista DIS, Santi CG, Maruta CW, Delgado L, Aoki V. Exfoliative erythroderma as a clinical manifestation of autoimmune bullous diseases. *Int J Dermatol*. febbraio 2016;55(2):e112-114.

103. Waisbourd-Zinman O, Ben-Amitai D, Cohen AD, Feinmesser M, Mimouni D, Adir-Shani A, et al. Bullous pemphigoid in infancy: Clinical and epidemiologic characteristics. *J Am Acad Dermatol*. gennaio 2008;58(1):41–8.

104. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet Lond Engl*. 26 gennaio 2013;381(9863):320–32.

105. Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev*. dicembre 2010;10(2):84–9.

106. Kelly SE, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol*. gennaio 1988;118(1):31–40.

107. Ruggiero A, Megna M, Villani A, Comune R, Fabbrocini G, di Vico F. Strategies to Improve Outcomes of Bullous Pemphigoid: A Comprehensive Review of Clinical Presentations, Diagnosis, and Patients' Assessment. *Clin Cosmet Investig Dermatol* [Internet]. 14 aprile 2022 [citato 17 maggio 2023];15:661–73. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9014958/>
108. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*. dicembre 2004;64(6):631–49.
109. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*. gennaio 2009;54(1):15–39.
110. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2017;8:292.
111. Harden JL, Krueger JG, Bowcock AM. The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. novembre 2015;64:66–73.
112. Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grötzinger J, Schultz E, et al. T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 marzo 2004;172(6):3883–92.
113. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest*. marzo 2000;105(5):625–31.
114. Ohata C, Ishii N, Koga H, Fukuda S, Tateishi C, Tsuruta D, et al. Coexistence of autoimmune bullous diseases (AIBDs) and psoriasis: A series of 145 cases. *J Am Acad Dermatol*. luglio 2015;73(1):50–5.

115. Tsai TF, Wang TS, Hung ST, Tsai PIC, Schenkel B, Zhang M, et al. Epidemiology and comorbidities of psoriasis patients in a national database in Taiwan. *J Dermatol Sci.* luglio 2011;63(1):40–6.
116. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Cohen AD. Association between pemphigus and psoriasis: A population-based large-scale study. *J Am Acad Dermatol.* dicembre 2017;77(6):1174–5.
117. Chen YJ, Wu CY, Lin MW, Chen TJ, Liao KK, Chen YC, et al. Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: a nationwide population-based study. *Br J Dermatol.* settembre 2011;165(3):593–9.
118. Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, et al. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol.* marzo 2010;37(3):231–8.
119. Hoshina D, Sawamura D, Nomura T, Tanimura S, Abe M, Onozuka T, et al. Epidermolysis bullosa acquisita associated with psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* settembre 2007;32(5):516–8.
120. Ohashi M, Takagi H, Mizutani Y, Seishima M, Koga H, Hashimoto T. Bullous pemphigoid with IgG autoantibodies to the $\alpha 3$ subunit of laminin 332 associated with psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol EJD.* 1 giugno 2017;27(3):306–7.
121. Heaphy MR, Winkelmann RK. Coexistence of benign familial pemphigus and psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol.* novembre 1976;112(11):1571–4.
122. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* settembre 1985;13(3):450–6.
123. Owczarek W. The role of HLA-Cw6 in psoriasis and psoriatic arthritis.

Reumatologia [Internet]. 2022 [citato 22 maggio 2023];60(5):303–5. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9661405/>

124. Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Jónsson HH, et al. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. *J Invest Dermatol.* aprile 2006;126(4):740–5.

125. Gulliver WP, Macdonald D, Gladney N, Alaghebandan R, Rahman P, Adam Baker K. Long-term prognosis and comorbidities associated with psoriasis in the Newfoundland and Labrador founder population. *J Cutan Med Surg.* 2011;15(1):37–47.

126. Mallon E, Bunce M, Savoie H, Rowe A, Newson R, Gotch F, et al. HLA-C and guttate psoriasis. *Br J Dermatol.* dicembre 2000;143(6):1177–82.

127. Sanchez DP, Sonthalia S. Koebner Phenomenon. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citato 22 maggio 2023]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553108/>

128. Szczerkowska Dobosz A, Rebała K, Szczerkowska Z, Nedoszytko B. HLA-C locus alleles distribution in patients from northern Poland with psoriatic arthritis--preliminary report. *Int J Immunogenet.* dicembre 2005;32(6):389–91.

129. Shlyankevich J, Mehta NN, Krueger JG, Strober B, Gudjonsson JE, Qureshi AA, et al. Accumulating Evidence for the Association and Shared Pathogenic Mechanisms between Psoriasis and Cardiovascular-Related Co-morbidities. *Am J Med* [Internet]. dicembre 2014 [citato 7 giugno 2023];127(12):1148–53. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259841/>

130. Eder L, Abji F, Rosen CF, Chandran V, Cook RJ, Gladman DD. The Association of HLA-class I Genes and the Extent of Atherosclerotic Plaques in Patients with Psoriatic Disease. *J Rheumatol.* ottobre 2016;43(10):1844–51.

131. Singh S, Sonkar GK, Usha null, Singh S. Celiac disease-associated antibodies in patients with psoriasis and correlation with HLA Cw6. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(4):269–72.
132. Mallon E, Young D, Bunce M, Gotch FM, Easterbrook PJ, Newson R, et al. HLA-Cw*0602 and HIV-associated psoriasis. *Br J Dermatol.* settembre 1998;139(3):527–33.
133. Chen H, Hayashi G, Lai OY, Dilthey A, Kuebler PJ, Wong TV, et al. Psoriasis Patients Are Enriched for Genetic Variants That Protect against HIV-1 Disease. *PLoS Genet* [Internet]. 16 febbraio 2012 [citato 7 giugno 2023];8(2):e1002514. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343879/>
134. Jin Y, Zhang F, Yang S, Kong Y, Xiao F, Hou Y, et al. Combined effects of HLA-Cw6, body mass index and waist-hip ratio on psoriasis vulgaris in Chinese Han population. *J Dermatol Sci.* novembre 2008;52(2):123–9.
135. West J, Ogston S, Berg J, Palmer C, Fleming C, Kumar V, et al. HLA-Cw6-positive patients with psoriasis show improved response to methotrexate treatment. *Clin Exp Dermatol.* agosto 2017;42(6):651–5.
136. Li K, Huang CC, Randazzo B, Li S, Szapary P, Curran M, et al. HLA-C*06:02 Allele and Response to IL-12/23 Inhibition: Results from the Ustekinumab Phase 3 Psoriasis Program. *J Invest Dermatol.* dicembre 2016;136(12):2364–71.

