

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina – DIMED

Direttore: Prof. Roberto Vettor

Clinica Dermatologica “A. Breda”

TESI DI LAUREA

GENOTIPIZZAZIONE DI HLA-DQA1 E HLA-DQB1 IN PAZIENTI CAUCASICI
AFFETTI DA PEMFIGOIDE BOLLOSO

Relatore: Prof. Mauro Alaibac

Correlatore: Alvisè Sernicola

Laureanda: Agnese Rossi

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

ABSTRACT	1
SINOSSI	2
INTRODUZIONE	3
1. MALATTIE BOLLOSE AUTOIMMUNI.....	3
1.1 PEMFIGO	4
1.2 MALATTIE DEL GRUPPO DEL PEMFIGOIDE.....	10
1.3 PEMFIGOIDE BOLLOSO.....	13
2. HLA-DQ.....	26
SCOPO DELLO STUDIO.....	28
MATERIALI E METODI.....	29
1. DISEGNO E POPOLAZIONE OGGETTO DELLO STUDIO	29
2. TECNICHE DI LABORATORIO.....	29
3. ANALISI STATISTICA	32
RISULTATI	33
DISCUSSIONE	34
CONCLUSIONI	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

ABSTRACT

Background: Bullous pemphigoid is the most frequent cutaneous autoimmune disease: it is prevalent in elderly people, and it is caused by the production of IgG autoantibodies directed against the hemidesmosomal proteins BP180 and BP230. The clinical presentation is characterized by subepidermal blisters associated with severe itching, and the diagnosis is made by direct and indirect immunofluorescence, ELISA test, and histopathological examination.

The role of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes in the pathogenesis of celiac disease has been extensively investigated; however, not much is known regarding their role in other autoimmune conditions, including bullous pemphigoid: in the recent literature only a few studies are available on this topic.

Aim of the study: The aim of our study was to assess HLA-DQ genes in subjects with a diagnosis of bullous pemphigoid. To achieve this objective we measured the frequency of HLA-DQA1 and DQB1 alleles and haplotypes in a sample of subjects with bullous pemphigoid.

Materials and methods: We enrolled a sample of 52 patients with bullous pemphigoid; molecular biology studies using whole blood samples have been carried out for the evaluation of the HLA alleles of these patients, based on a multiparameter analysis using EUROArray.

Results: The results show a frequency of HLA-DQA1*05 gene equal to 82.69%, therefore higher than that observed by literature in healthy Caucasian patients; in this case, in fact, the frequency of the same gene is 13.16%.

Conclusions: Our results also agree with previous studies, which also showed an increased frequency of HLA-DQA1*05 allele in Caucasian patients with bullous pemphigoid. It is therefore hoped that further studies will be carried out on a broader patient population, to confirm our preliminary results.

SINOSSI

Background: Il pemfigoide bolloso è la più frequente delle patologie autoimmuni bollose cutanee, prevalente in soggetti anziani e causata dalla produzione di autoanticorpi IgG rivolti contro le proteine emidesmosomiali BP180 e BP230. La clinica si caratterizza per la comparsa di bolle subepidermiche associate a un grave prurito, e la diagnosi è posta mediante immunofluorescenza diretta e indiretta, test ELISA, ed esame istopatologico. Il ruolo dei geni HLA-DQA1 e HLA-DQB1 è stato ampiamente studiato nella patogenesi della celiachia ma poco è noto in relazione ad altre patologie autoimmuni, come il pemfigoide bolloso: in letteratura, infatti, si hanno solo pochi studi per quanto riguarda le patologie bollose, di recente pubblicazione.

Scopo dello studio: Lo scopo del presente studio è la valutazione dei geni HLA-DQ in soggetti affetti da pemfigoide bolloso. Per raggiungere tale scopo è stata valutata la frequenza degli alleli e degli aptotipi HLA-DQA1 e HLA-DQB1 in un campione di individui con diagnosi di BP.

Materiali e metodi: È stato reclutato un campione di 52 pazienti affetti da pemfigoide bolloso; 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: I risultati mostrano una frequenza del gene HLA-DQA1*05 pari all'82,69%, dunque superiore a quella che si osserva dalla letteratura in pazienti sani caucasici; in questo caso infatti la frequenza del medesimo gene è del 13,16%.

Conclusioni: Tali risultati sono inoltre concordi con precedenti studi svolti, che egualmente avevano evidenziato un'aumentata frequenza dell'allele HLA-DQA1*05 in pazienti caucasici affetti da pemfigoide bolloso. Si auspica dunque che ulteriori studi saranno svolti su un campione più ampio di soggetti, per fornire conferma dei nostri risultati preliminari.

INTRODUZIONE

1. MALATTIE BOLLOSE AUTOIMMUNI

Le malattie bollose autoimmuni comprendono le patologie del gruppo del pemfigo e del pemfigoide, condizioni mediate dallo sviluppo di autoanticorpi IgG contro, rispettivamente, le componenti dei desmosomi e degli emidesmosomi, molecole di adesione espresse a livello cutaneo e mucoso. Da ciò ne deriva un'eruzione bollosa cutanea e/o mucosale [1].

Nello specifico, i desmosomi mediano l'adesione tra cheratinociti adiacenti, mentre gli emidesmosomi tra cheratinociti e derma sottostante; conseguentemente, nel pemfigo, vista la presenza di autoanticorpi contro i desmosomi si osserva un clivaggio intraepidermico, mentre nel pemfigoide, dove si riscontrano autoanticorpi rivolti contro gli emidesmosomi, il clivaggio è subepidermico.

La diagnosi è clinica, supportata da biopsia, immunofluorescenza diretta, mediante cui si ricercano autoanticorpi tissutali, e immunofluorescenza indiretta, per la valutazione degli autoanticorpi circolanti. Di recente, inoltre, ampiamente utilizzato è il test enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Il trattamento si fonda invece sulla somministrazione di corticosteroidi, immunosoppressori. Trovano anche utilizzo farmaci biologici quali rituximab e omalizumab.

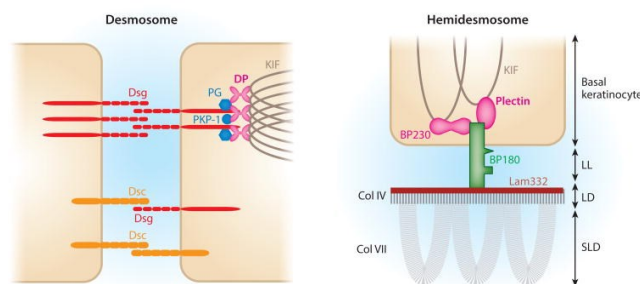


Figura 1 - Schematizzazione della struttura di desmosomi e emidesmosomi.

Tratto da: Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:175-197.

1.1 PEMFIGO

Sotto tale nomenclatura, si riconoscono una molteplicità di sottotipi, i quali differiscono gli uni gli altri in relazione alle differenti caratteristiche cliniche e alla fisiopatologia: le forme più comuni, su cui la trattazione in questione si soffermerà, sono rappresentate dal pemfigo volgare (PV) e dal pemfigo foliaceo (PF), ma si citano anche il pemfigo IgA e il pemfigo paraneoplastico.

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

La diffusione del PV e del PF varia nelle differenti regioni. Nello specifico, in Europa e in Nord America, il 65-90% dei casi di pemfigo sono di PV. Il foliaceo è invece più diffuso del volgare in Sud America e in Nord Africa.

Le più alte incidenze di PV si osservano in Iran (16.0 per milione), in Israele (16.1 per milione) e in Connecticut (32.0 per milione).

In relazione all'età di comparsa, il pemfigo può esordire in ogni età, con una prevalenza della fascia compresa tra i 45 e i 65 anni. Il sesso femminile è tipicamente più colpito [2].

1.1.2 PATOFISIOLOGIA

Come è già stato accennato, centrale nella genesi della patologia è lo sviluppo di autoanticorpi IgG rivolti contro i desmosomi; nello specifico, i bersagli antigenici nel PV e nel PF, sono le desmogleine, glicoproteine appartenenti alla superfamiglia delle caderine e facenti parte del complesso desmosomiale. In particolare, nel PV gli autoanticorpi sono diretti contro la desmogleina 3 e 1, mentre nel PF contro la sola desmogleina 1.

Tali molecole si caratterizzano per una differenza distribuzione a livello cutaneo e mucosale:

-a livello cutaneo sono ambo espresse, tuttavia la Dsg1 è presente in tutti gli strati dell'epidermide, con predominanza nel versante superficiale, mentre la Dsg3 esclusivamente negli strati profondi;

-a livello mucoso la Dsg1 è minimamente espressa, con predominanza della Dsg3.

La localizzazione dell'eruzione bollosa, caratteristica del pemfigo, varia in base al sottotipo considerato, e ciò può essere spiegato facendo riferimento alla teoria della compensazione della desmogleina, per cui la presenza di un solo tipo di Dsg è sufficiente per impedire il manifestarsi della malattia a livello cutaneo e/o mucoso.

Alla luce di ciò, nel PF si osserverà un'eruzione vescicolare superficiale cutanea, senza alcun coinvolgimento mucosale; al contrario, in pazienti con PV, nel caso in cui si abbiano solo anticorpi anti Dsg3, si osserverà un esclusivo coinvolgimento mucosale, mentre in presenza di anticorpi rivolti sia contro Dsg1 sia contro Dsg3, il coinvolgimento sarà muco-cutaneo [3].

Tale perdita di coesione cellulare prende il nome di acantolisi. Molteplici meccanismi sono stati descritti per spiegare questo fenomeno; in particolare, si presume che questo sia conseguente a un'alterazione delle vie di segnalazione mediate dalla MAP-chinasi, p38, PKC, JNK, RhoA, e diverse caspasi, fondamentali nella regolazione del citoscheletro e della funzione dei desmosomi [4].

Un'altra teoria sottolinea come il meccanismo apoptotico sia implicato nel favorire la dissociazione cellulare, sebbene non strettamente necessario, visto lo sviluppo di acantolisi anche in assenza di apoptosi [5].

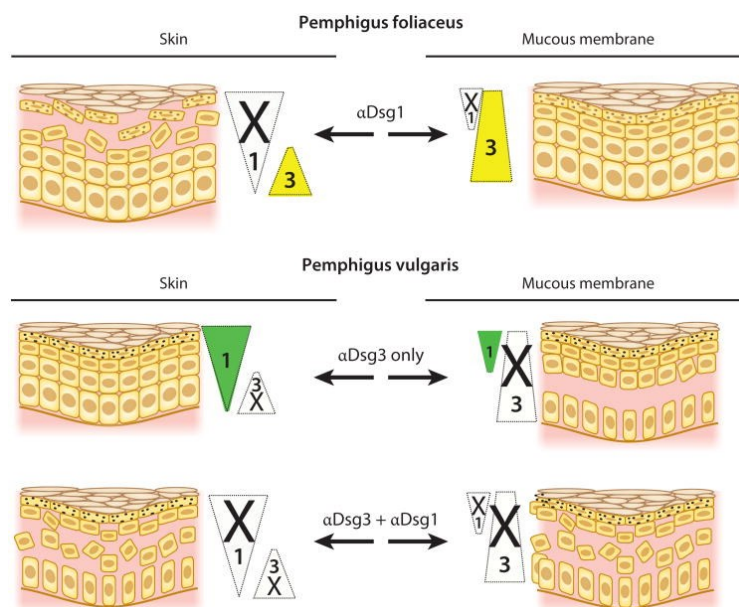


Figura 2 - Teoria della compensazione nel pemfigo: i triangoli rappresentano le comuni localizzazioni di Dsg1 e Dsg3 su cute e mucose; lo spessore del triangolo è indicativo della quantità di Dsg su ciascun livello cellulare. Un triangolo bianco segnala la perdita di funzione di una determinata Dsg in conseguenza alla presenza di anticorpi anti-Dsg1 e/o anti-Dsg3. Laddove Dsg1 o Dsg3 sia inattivata, e non sia presente l'altra Dsg a compensare, si sviluppa una lesione.

Tratto da: Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol.* 2016 May 23;11:175-97

1.1.3 CLINICA

Pemfigo volgare

In relazione al PV, come prima accennato, si identificano sostanzialmente due differenti forme: una caratterizzata da un coinvolgimento esclusivamente mucosale, e un'altra contraddistinta invece da un coinvolgimento sia di tipo mucoso, sia di tipo cutaneo. In ambo i casi, si sviluppa una dolorosa eruzione vescicolare, con esiti in ulcerazione; tipicamente non si sviluppano cicatrici, anche se si sottolinea come un'iperpigmentazione post-infiammatoria possa essere presente. Nello specifico, il cavo orale rappresenta il più comune sito di interessamento mucosale; in seguito, si può avere un coinvolgimento di altri siti, quali l'occhio, il naso, l'esofago, e l'area genitale. La sintomatologia del pemfigo può quindi comprendere anche irritazione oculare, disfagia, disfonia, irritazione vaginale e dispareunia [3].

Le manifestazioni cutanee si localizzano invece preferenzialmente a livello del cuoio capelluto, collo, ascelle e parte superiore del tronco [6].



Figura 3 – Pemfigo volgare: tipica eruzione vescicolare, con esiti in erosioni crostose.

Tratto da:

Malik AM, Tupchong S, Huang S, Are A, Hsu S, Motaparathi K. An Updated Review of Pemphigus Diseases. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 9;57(10):1080

Da un punto di vista dell'esame obiettivo, molto utile è la ricerca del segno di Nikolsky, positivo in caso di pemfigo, necrolisi epidermica tossica e della sindrome della cute ustionata da stafilococco; tale segno permette infatti di distinguere un'eruzione bollosa intraepidermica da una subepidermica. Nello specifico, in tale patologie si osserva come andando ad applicare una pressione a livello di una bolla, si verifici una desquamazione cutanea e un aumento delle dimensioni della bolla [7].

Pemfigo foliaceo

Come già accennato, in questo caso si osserva un esclusivo coinvolgimento cutaneo, con risparmio mucosale; sono nello specifico coinvolte prevalentemente aree seborroiche, quali il cuoio capelluto, il viso e la regione superiore del tronco. Clinicamente si riscontrano vescicole sparpagliate, che danno luogo a erosioni crostose su base eritematosa. Le lesioni sono più superficiali rispetto a quelle del PV, con coinvolgimento esclusivo dello strato corneo. Anche in questo caso il segno di Nikolsky è positivo [3].



Figura 4 - Pemfigo foliaceo.

Coinvolgimento del cuoio capelluto.

Tratto da: Malik AM, Tupchong S, Huang S, Are A, Hsu S, Motaparathi K. An Updated Review of Pemphigus Diseases. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 9;57(10):1080

1.1.4 DIAGNOSI

La diagnosi di PV è fondata sull'adempimento dei tre seguenti criteri:

1. Clinica del paziente
2. Biopsia
3. Riscontro di autoanticorpi mediante immunofluorescenza diretta e indiretta

Utile è inoltre lo svolgimento del test ELISA, di seguito poi approfondito.

Biopsia

All'esame biotico di una bolla si riscontrano le seguenti caratteristiche:

- clivaggio intraepidermico con acantolisi sovrabasale
- discheratosi dello strato granuloso
- infiltrato dermico di eosinofili, linfociti e neutrofili, associato a dilatazione dei capillari del derma papillare [8].

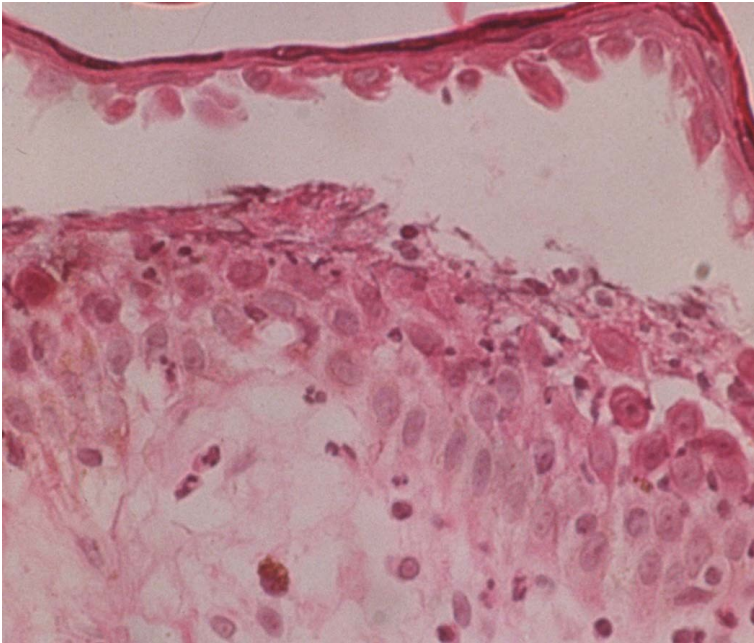


Figura 5 - Esame istopatologico di un caso di pemfigo foliaceo.

Evidenza di bolla sovrabasale conseguente ad acantolisi.

Tratto da: James KA, Culton DA, Diaz LA. Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin.* 2011 Jul;29(3):405-12, viii.

Immunofluorescenza diretta

Con l'immunofluorescenza diretta si va a ricercare la presenza di autoanticorpi a livello tissutale; solitamente vengono rilevati depositi intercellulari di IgG, C3 e IgA con caratteristico pattern "a rete".

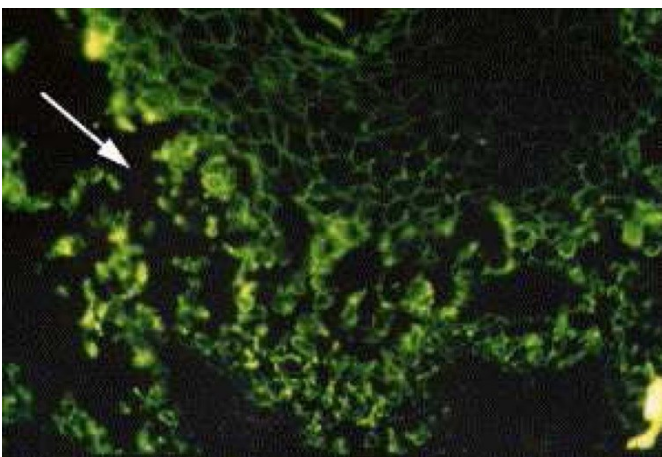


Figura 6 - Immunofluorescenza diretta in un caso di pemfigo volgare. Si vede il patognomico pattern a rete.

Tratto da: Ettlín DA. Pemphigus. *Dent Clin North Am* 2005;49:107-25

Immunofluorescenza indiretta

Sfruttando come substrato esofago di scimmia, si va a ricercare la presenza di autoanticorpi IgG circolanti nel siero del paziente; questi andranno a legarsi a livello intraepidermico [9].

Test ELISA

Il test ELISA è un metodo quantitativo utile a misurare i livelli degli anticorpi anti-Dsg1 e anti-Dsg3. È attualmente il test diagnostico di riferimento, in virtù di una specificità e sensibilità del 90%; è inoltre molto utile per valutare l'efficacia del trattamento. È stato infatti dimostrato come i livelli anticorpali degli anticorpi anti-desmogleina, a seguito di un corretto trattamento, vadano incontro a una significativa riduzione. Ciò chiaramente si associa di pari passo a un miglioramento clinico del paziente [10].

1.1.5 TRATTAMENTO

La terapia di prima linea prevede la somministrazione di prednisone, con dosaggi da 0,5 a 1,5 mg/Kg/die, per via orale o endovenosa; i dosaggi saranno poi progressivamente ridotti, una volta ottenuta la remissione clinica della patologia. In presenza di recidive, è indicato il trattamento con immunosoppressori quali azatioprina (1-3mg/kg/die) e micofenolato mofetile (30mg/kg-45mg/kg/die); questi possono anche essere utilizzati in prima linea, in aggiunta ai corticosteroidi, in forme severe, o in loro sostituzione, in pazienti non tolleranti a questi.

Il rapporto al micofenolato mofetile, si evidenzia come questo non sia raccomandato in gravidanza, in virtù di un possibile rischio teratogeno; l'azatioprina d'altra parte si associa a un aumento del rischio di riduzione della funzionalità del midollo osseo e di linfoma [11].

Possibile è inoltre l'utilizzo dell'immunosoppressore ciclofosfamide, sebbene associato a una riduzione della fertilità [12].

Altre possibilità terapeutiche sono l'immunoassorbimento, la somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa (IVIG), il metotrexato e la plasmaferesi [13].

In ultima istanza, laddove nemmeno la terapia immunosoppressiva sia efficace, è possibile somministrare rituximab, un anticorpo monoclonale anti-CD20 (2 infusioni endovenose di 1000mg ogni 15 giorni); l'efficacia di tale farmaco è rilevante, con una percentuale di pazienti che raggiungono la remissione clinica compresa tra il 59 e il 100% [14].

1.2 MALATTIE DEL GRUPPO DEL PEMFIGOIDE

Nel complesso delle malattie del gruppo del pemfigoide sono classificate le malattie bollose autoimmuni, caratterizzate dallo sviluppo di autoanticorpi contro gli emidesmosomi della giunzione dermo-epidermica. In questo caso, contrariamente al pemfigo, l'eruzione bollosa è subepidermica. Sotto tale gruppo, ricadono nello specifico il pemfigoide delle membrane mucose, il pemfigoide gestazionale, l'epidermolisi bollosa acquisita, le dermatosi da IgA lineari e la dermatite erpetiforme di Duhring.

1.1.6 Pemfigoide delle membrane mucose (o cicatriziale)

Il pemfigoide delle membrane mucose è una patologia caratterizzata da un interessamento primario delle membrane mucose, con raro coinvolgimento cutaneo. In particolare, i siti più interessati sono la mucosa orale e quella oculare; possibile è inoltre un interessamento della mucosa nasofaringea, esofagea, laringea e genitale. Su questi siti si sviluppa un'eruzione bollosa, con secondaria ulcerazione e sviluppo di cicatrici deformanti. La gravità e l'estensione del quadro sono altamente variabili; si sottolinea comunque come il coinvolgimento della laringe e dell'esofago possa esitare in quadri stenotici potenzialmente fatali [15].

I principali antigeni bersaglio degli autoanticorpi sono BP180 (con frequenza del 75% nel siero dei pazienti affetti), la laminina-332, la subunità beta4 dell'integrina alfa6beta4 e il collagene di tipo VII [16].

1.1.7 Pemfigoide gestazionale

Il pemfigoide gestazionale è una rara patologia autoimmune che si sviluppa durante la gravidanza (più frequentemente secondo e terzo trimestre) o durante il puerperio, in conseguenza ad anticorpi rivolti contro l'antigene placentare BP180.

Esordisce con lo sviluppo di papule e placche urticanti pruriginose, tipicamente a livello addominale, poi seguite da vescicole e bolle. Un altro frequente sito di esordio, oltre all'addome, è rappresentato dalle estremità. Raro è il coinvolgimento della faccia o delle mucose. Dopo alcune settimane, le lesioni vanno incontro a risoluzione spontanea [17].

1.1.8 Epidermolisi bollosa acquisita

L'epidermolisi bollosa acquisita è una rara patologia bollosa causata dallo sviluppo di autoanticorpi rivolti contro il collagene 7, molecola costituente le fibrille di ancoraggio, che mediano l'attacco dell'epidermide al derma.

Da un punto di vista clinico, si possono identificare cinque possibili presentazioni: la presentazione “classica”, la forma simile al pemfigoide bolloso, la forma simile al pemfigoide mucoso, la forma simile alla dermatosi da IgA e la forma simile al pemfigoide di Brunsting-Perry.

-presentazione “classica”: forma meccanobollosa, non infiammatoria, caratterizzata dallo sviluppo di bolle sul dorso delle mani, sulle nocche, gomiti, ginocchia, area sacrale e piedi. Si prediligono dunque le aree estensorie, maggiormente soggette a traumatismi [18].

La guarigione può esitare nei casi più gravi in alopecia cicatriziale e onicodistrofia [19].

-forma simil-pemfigoide bolloso: eruzione bollosa diffusa, prevalente su tronco, estremità e pieghe delle mani, tipicamente accompagnata da prurito. Le bolle sono tese, su base eritematosa o orticarioide.

Nella forma simile al pemfigoide cicatriziale si osserva un tipico coinvolgimento mucosale, mentre la forma simile al pemfigoide di Brunsting-Perry si osserva un coinvolgimento di collo e testa, senza coinvolgimento mucosale [18].

1.1.9 Dermatosi da IgA lineari

Rara patologia bollosa autoimmune, che può interessare sia adulti sia bambini. Le vescicole, specie nei bambini, hanno una disposizione simil collana di perle; nell’adulto tale presentazione è più rara, e prevale la presenza di papule e placche orticarioidi. Tipicamente le lesioni coinvolgono il volto, specialmente l’area periorale e i genitali. Il prurito è un sintomo comune, e può essere severo.

Caratteristica è la presenza di IgA a livello della membrana basale, che può essere rilevata mediante immunofluorescenza diretta [20].

1.1.10 Dermatite erpetiforme di Duhring

La dermatite erpetiforme di Duhring è una patologia strettamente associata alla celiachia, che si verifica tipicamente nei giovani adulti, ma può anche interessare bambini o anziani. La maggior parte dei pazienti con dermatite erpetiforme presenta istologicamente atrofia dei villi intestinali, sebbene nella maggior parte dei casi la celiachia sia asintomatica.

Si manifesta con vescicole, papule e lesioni orticarioidi, tipicamente distribuite in modo simmetrico sulle superfici estensorie dei gomiti e delle ginocchia, e a livello del sacro, delle natiche e dell’occipite. Le lesioni sono intensamente pruriginose.

La diagnosi è confermata dal riscontro di depositi di IgA sulle papille dermiche [21].

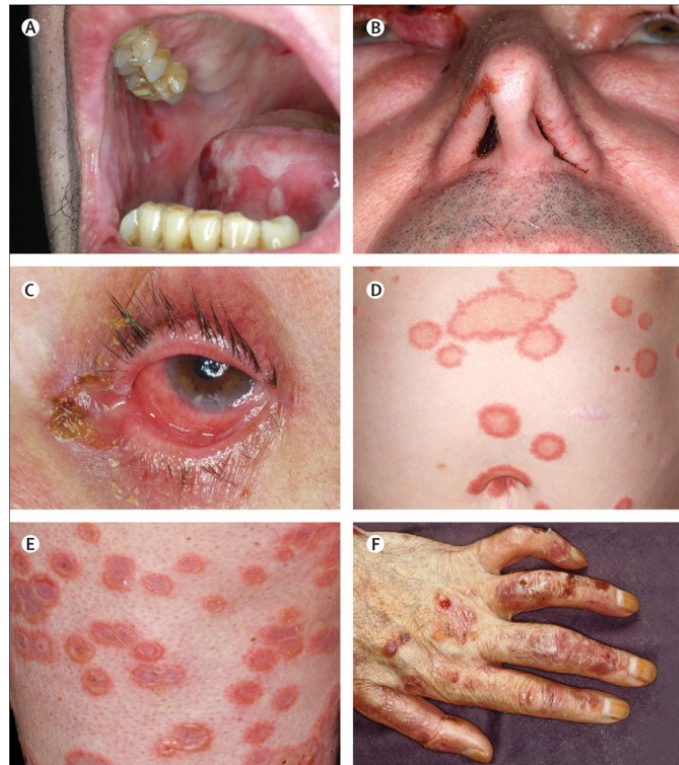


Figura 7 - Manifestazioni delle malattie del gruppo del pemfigoide: placche fibrinose nella cavità orale (A), croste emorragiche nelle narici (B), congiuntivite e symblepharon (C) nel pemfigoide delle membrane mucose; placche circolari sull'addome (D) nel pemfigoide gestazionale, placche ad anello eritematose (E) nella dermatosi ad Ig-A lineare, vescicole ed erosioni sulle dita nell'epidemolisi bollosa acquisita (F).

Tratto da: Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 2013;381(9863):320-32.)

1.2 PEMFIGOIDE BOLLOSO

Il pemfigoide bolloso (PB) è la più frequente malattia bollosa autoimmune; in essa si osserva un'eruzione bollosa supbepidermica, in conseguenza allo sviluppo di autoanticorpi IgG rivolti contro le proteine emidesmosomiali BP180 e BP230.

1.3.1 EPIDEMIOLOGIA

L'incidenza annuale del PB è compresa tra i 2.4 e i 21.7 casi per milione [22] [23]. Tipicamente interessa soggetti anziani, con un'età media di insorgenza compresa tra i 63 e gli 80 anni; coerentemente, l'incidenza nei soggetti di età superiore agli 80 anni è molto superiore a quella sopra riportata, e varia tra i 190 ai 312 nuovi casi per milione all'anno [23] [24]. Rara è invece nei soggetti di età inferiore ai 50 anni; in questo caso l'incidenza è inferiore agli 0,5 casi per milione all'anno [25]. Molti studi hanno inoltre dimostrato che l'incidenza sembra essere superiore nelle donne sotto i 75 anni, mentre sopra i 75 anni prevale nei maschi [24].

Si è riportato inoltre un aumento dell'incidenza di circa 3.3 volte in Francia in 14 anni, 2.2 volte in Germania in 8 anni e 4.3 volte in UK in 17 anni: ciò è dovuto a una molteplicità di condizioni, quali l'aumento dell'aspettativa di vita della popolazione e delle condizioni neurologiche disabilitanti, il maggiore utilizzo di alcuni farmaci (*poi descritti*) e il miglioramento delle tecniche diagnostiche [22] [24] [26].

1.3.2 FATTORI SCATENANTI

Farmaci

Lo sviluppo di pemfigoide bolloso è stato frequentemente associato all'assunzione di terapie sistemiche. In particolare i farmaci implicati sono antibiotici, neurolettici, beta-bloccanti, FANS, diuretici e più recentemente farmaci anti TNF-alfa, DPP-4 inibitori, e inibitori dei checkpoint immunitari (anti PD-1/PDL-1 e anti CTLA4) [27].

Infezioni

Ci sono varie modalità attraverso cui un patogeno può indurre una reazione autoimmune; una possibilità è legata allo sviluppo di autoanticorpi cross-reattivi, che vadano a bersagliare gli antigeni della cellula ospite simili a quelli del patogeno; un virus può inoltre infettare direttamente i cheratinociti, inducendo dunque l'espressione di epitopi nascosti o modificando quelli esistenti [27]. Alcuni autori hanno riscontrato un legame del pemfigoide bolloso con gli herpes virus, quali CMV, EBV, HHV-6 e HHV-8 [28].

A questi, si aggiungono anche i patogeni HCV, HBV [29], *Toxoplasma gondii* e *Helicobacter pylori* [30].

Fattori Fisici

I fattori scatenanti più comunemente riportati nella BP sono: RT (25,4%), UV (25,1%), procedure chirurgiche (37%), ustioni termiche o chimiche (9,5%). Altri fattori (graffi, traumi meccanici, puntura di insetto, iniezione di colorante) sono stati occasionalmente segnalati [31].

Deficit di vitamina D

La vitamina D ha un riconosciuto ruolo immunomodulatorio, e un suo deficit si associa a un aumentato rischio di sviluppo di patologie autoimmuni [32].

Coerentemente, nei pazienti affetti da BP sono stati rilevati ridotti livelli di 25-idrossivitamina D [33]; altri studi hanno nello specifico dimostrato come i livelli di 25-idrossivitamina D siano inversamente proporzionali alla gravità della patologia [34].

1.3.3 COMORBIDITÀ

-comorbidità neurologiche

Molteplici studi condotti su larga scala hanno dimostrato un'associazione del PB con patologie neurologiche quali il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, la sclerosi multipla e lo stroke. [35] [36]. È stata inoltre messa in luce da altri studi un'associazione con disturbi quali epilessia, demenza e schizofrenia [37].

Nello specifico, è stato dimostrato come pazienti con demenza e Parkinson hanno una probabilità tre volte più alta nello sviluppare PB, mentre in pazienti con epilessia e stroke si osserva una probabilità 2 volte più alta [35] [38].

Molteplici ipotesi sono state proposte per spiegare ciò: una delle più accreditate, evidenzia come il sistema nervoso e la cute presentino gli stessi antigeni (BPAG1/BP230 e BPAG2/BP180) ma in due isoforme diverse. Nello specifico, l'antigene BP180 è stato riscontrato nell'ippocampo, nel talamo e nel mesencefalo.

È possibile che, in conseguenza a una danno cerebrale, causato proprio dalle patologie sopra descritte, si osservi uno smascheramento dell'antigene BP180 con conseguente produzione di autoanticorpi con cross-reattività a livello cutaneo [39].

-comorbidità con altre patologie autoimmuni e dermatologiche

Studi hanno dimostrato la sussistenza di un'associazione tra il PB e patologie autoimmuni quali il LES, il lichen planus, la nefropatia membranosa, l'anemia perniciosa, tiroiditi, cirrosi biliare primitiva, la psoriasi e la polimiosite (a questo elenco si aggiunge inoltre la già citata sclerosi multipla) [40] [41].

Inoltre nel contesto del PB sono stati osservati aumentati livelli di anticorpi anti-nucleo, anti-muscolo liscio, nonché del fattore reumatoide [42].

In merito all'associazione tra psoriasi e PB, questa sembra essere più frequente nei maschi, e nella maggior parte dei casi la psoriasi precede lo sviluppo di PB [43].

Alla luce di ciò, è stato supposto che l'insorgenza di PB sia conseguente a eventi epigenetici legati alla cascata infiammatoria psoriasica; c'è infatti evidenza che i linfociti Th17 e l'interleuchina 17 favoriscano la produzione di metalloproteinasi, citochine infiammatorie, eosinofili e neutrofili, tutti elementi importanti nella patogenesi del PB [44].

-associazione con neoplasie

Molteplici studi hanno suggerito un'associazione con neoplasie ematologiche; in particolare è stata dimostrata un'associazione con malattia di Hodgkin, linfoma non follicolare, linfoma a cellule T/NK e leucemia linfoide. [45]

Sono stati individuati tre possibili meccanismi patogenetici che potrebbero spiegare tale legame: il primo evidenzia come l'eruzione bollosa possa essere conseguenza di una cross-reattività di autoanticorpi rivolti contro antigeni tumorali; il secondo sottolinea come la secrezione da parte delle cellule tumorali di una sostanza simile agli ormoni causi un danno alla membrana basale, con secondaria produzione di anticorpi anti-desmosomi. L'ultimo evidenzia invece come il danno alla membrana basale possa essere conseguente a un virus cancerogeno. [46]

-associazione con malattie cardiovascolari

Molteplici studi hanno indicato la presenza di un'associazione tra PB e malattie cardiovascolari [47] [48]. Nello specifico, è stato dimostrato come il numero di morti per patologie cardiovascolari in pazienti affetti da PB sia superiore rispetto alla popolazione della stessa età e sesso non affetta [49]. In particolare 7 pazienti su 20 presentano episodi di tromboembolismo, con coinvolgimento di vari organi, tra cui cervello e polmoni [50]. Tale associazione potrebbe essere spiegata dallo stato di ipercoagulabilità tipico dei pazienti con BP, conseguente alla produzione di anticorpi anti-fosfolipidi [51].

1.3.4 PATOGENESI

Studi hanno dimostrato che la combinazione tra fattori predisponenti genetici, *successivamente approfondita*, e fattori ambientali, quali radiazioni UV, traumi e farmaci, possa contribuire alla perdita di tolleranza immunitaria verso gli antigeni della giunzione dermo-epidermica [52]. In aggiunta a ciò, si osserva uno squilibrio tra le cellule T regolatorie e le cellule T helper autoreattive [53] [54] nonché un'attivazione del sistema del recettore Toll-like e delle cellule T helper 17 (Th17) [55].

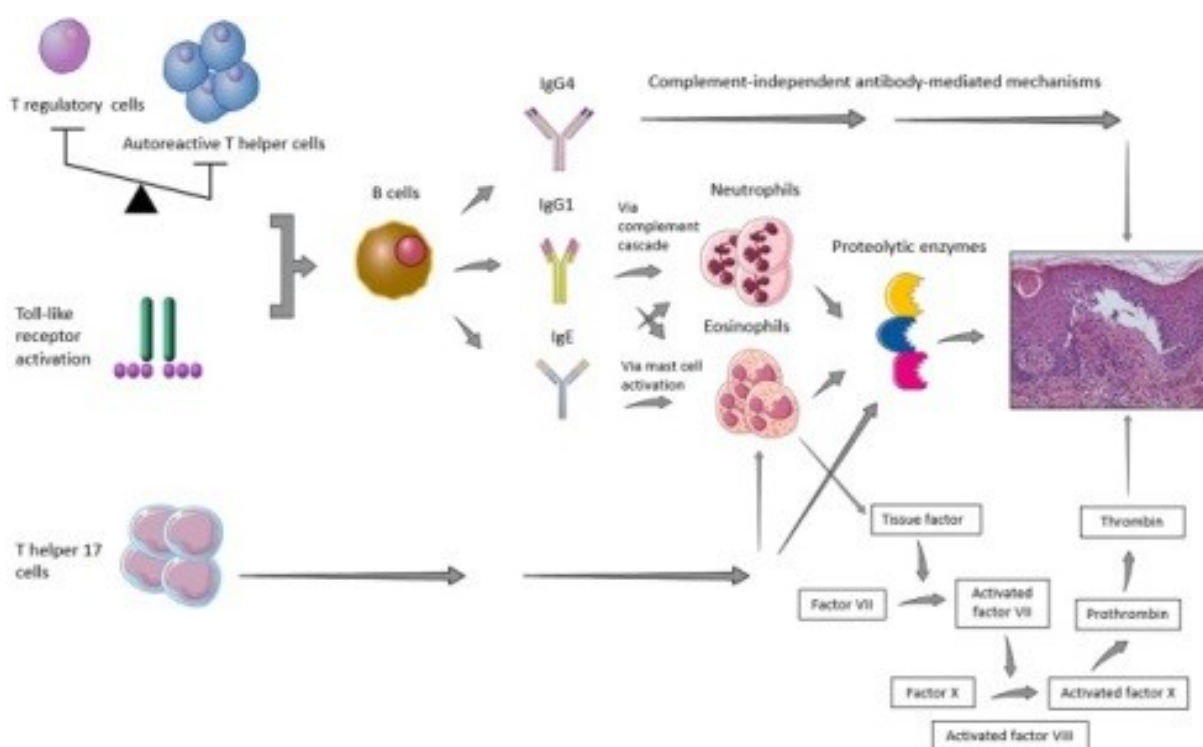


Figura 8 - Schematizzazione delle principali vie implicate nello sviluppo di eruzione bollosa in pazienti affetti da BP.

Tratto da: Genovese G, Di Zenzo G, Cozzani E, Berti E, Cugno M, Marzano AV. New Insights Into the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid: 2019 Update. *Front Immunol.* 2019 Jul 2;10:1506

Gli autoanticorpi maggiormente implicati sono gli IgG (soprattutto IgG1 e IgG4) e gli IgE mentre il principale bersaglio antigenico è la glicoproteina transmembrana BP180; nello specifico, tipicamente la porzione riconosciuta è il dominio extracellulare NC16A, ma è possibile anche un riconoscimento di altri domini, quali il dominio C-terminale e il dominio LAD-1 [56] [57].

Un altro possibile bersaglio antigenico è rappresentato dalla proteina intracellulare BP230: in tal caso ne viene riconosciuto il dominio C-terminale [58].

I meccanismi patogeni che concorrono nello sviluppo dell'eruzione bollosa secondaria al legame tra autoanticorpi e antigeni sono complessi, e possono distinguersi in forme complemento mediate e forme non complemento mediate.

Nelle forme non complemento mediate, centrale è il ruolo delle IgG4 [59]; in relazione al ruolo delle IgG1, è stato invece dimostrato come queste determinino un'attivazione della cascata del complemento, con secondario reclutamento di neutrofili, eosinofili e mastociti [60].

In merito agli eosinofili, si evidenzia una loro presenza a livello della giunzione dermo-epidermica; caratteristico è inoltre il riscontro di eosinofilia periferica [61] [62].

La degranolazione degli eosinofili, implicata nello sviluppo della caratteristica eruzione bollosa, sembrerebbe essere conseguente a un'interazione tra il recettore degli eosinofili e le IgE anti-BP180: tale evento causerebbe infatti il rilascio delle proteasi contenute nei granuli degli eosinofili, con conseguente separazione dermo-epidermica [63]. Si sottolinea inoltre come gli eosinofili siano un'importante fonte di rilascio di IL-31, citochina che stimola mediante recettori specifici i neuroni responsabili del prurito [64]. In aggiunta a ciò, gli eosinofili stimolano la cascata coagulativa implicata nella formazione delle lesioni bollose mediante la secrezione del fattore tissutale (TF) [65].

Gli anticorpi IgE anti-BP180 favoriscono anche la degranolazione dei mastociti, assieme ai frammenti C3a e C5a del complemento e agli anticorpi IgG anti-BP180; i mastociti inoltre mediante il rilascio di marcatori quali leucotrieni, fattore di attivazione delle piastrine, TNF- α , e altre citochine, richiamano i neutrofili [66]. A loro volta i neutrofili, attraverso proteasi quali l'elastasi neutrofila (NE), la catepsina G, le collagenasi, l'attivatore del plasminogeno, la plasmina, la MMP-2, la MMP-9 e la MMP-13 favoriscono il distacco dermo-epidermico [67].

1.3.5 CLINICA

-Forma classica

La forma classica colpisce persone anziane, di solito sopra i 70 anni e si manifesta con bolle pruriginose e tese su pelle normale o su base eritematosa/edematosa. Queste lesioni colpiscono principalmente le pieghe ascellari, l'addome inferiore, le aree inguinali e le parti interne delle cosce. Possono essere localizzate o diffuse. Il coinvolgimento della mucosa non è frequente ed è riportato nel 10-30% dei casi con lesioni orali, esofagee e genitali.

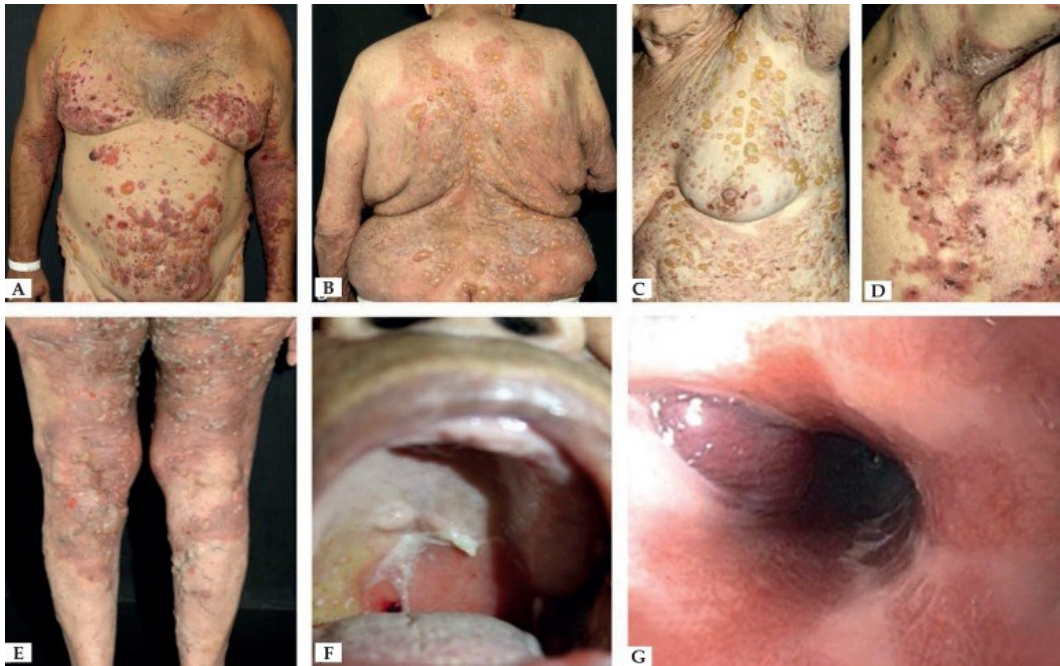


Figura 9 - Pemfigoide bolloso classico. Evidenza di eruzione bollosa emorragica (A) e sierosa (B) su base eritematosa; eruzione sierosa su cute normale (C); papule con escoriazioni e bolle con croste su piega ascellare (D); coinvolgimento mucosale a livello del palato (F) e dell'esofago. (G) Tratto da: Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019 Mar-Apr;94(2):133-146

Una delle presentazioni cliniche della PB è il lichen planus pemfigoide. I pazienti con questa condizione presentano placche e papule violacee pruriginose, simili a lesioni di lichene planus, di solito sulle estremità. Successivamente, vescicole compaiono sia su lesioni lichenoidi sia sulla pelle normale [68].

-Forma non bollosa

In merito alle forme non bollose, non è ben chiaro se considerarle come varianti della malattia o come fase prodromica della stessa. Secondo uno studio pubblicato nel 2017, solo il 9,8% dei pazienti che presentano PB non bollosa sviluppano vescicole durante il loro follow-up e raramente mostrano lesioni mucosali. I reperti clinici più frequenti includono prurito (100%), lesioni orticarioide eritematose (52,3%), escoriazioni (22,7%) o papule e noduli (20,5%) [69].



Figura 10 - Papule eritematose ed edematose a livello del tronco (A); presentazione simil eritema multiforme, con coinvolgimento delle cosce (B); evidenza di placche lichenoidi sul dorso della mano (C); escoriazioni su regione frontale (D); presentazione simil eczema: evidenza di placche confluenti sul tronco e su arti superiori (E); presentazione simil necrolisi epidermica tossica a livello del dorso (F). Tratto da: Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019 Mar-Apr;94(2):133-146.

-Eritroderma esfoliativo

L'eritroderma esfoliativo, privo di eruzione vescicolare, è un'altra rara modalità di presentazione del BP. Tale presentazione è in realtà più tipica di altre condizioni, quali il pemfigo foliaceo, la psoriasi, l'eczema, e le reazioni avverse a farmaci [70].



Figura 11 - Esempio di presentazione del PB con eritroderma esfoliativo senza vescicole.

Tratto da: Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019 Mar-Apr;94(2):133-146

-Forma infantile

Il PB può occasionalmente verificarsi in neonati e bambini: in questo caso, le lesioni interessano principalmente viso, palmi delle mani e piante dei piedi, con una maggior frequenza di lesioni generalizzate, che richiedono l'uso di corticosteroidi sistemici [71] [72].

1.3.6 DIAGNOSI

La diagnosi di PB parte dal sospetto clinico, ossia il riscontro in un paziente anziano di un'eruzione bollosa pruriginosa. Successivamente è possibile svolgere un'immunofluorescenza diretta che, se positiva, può essere confermata dalla immunofluorescenza indiretta o da un test ELISA. (Figura 12)

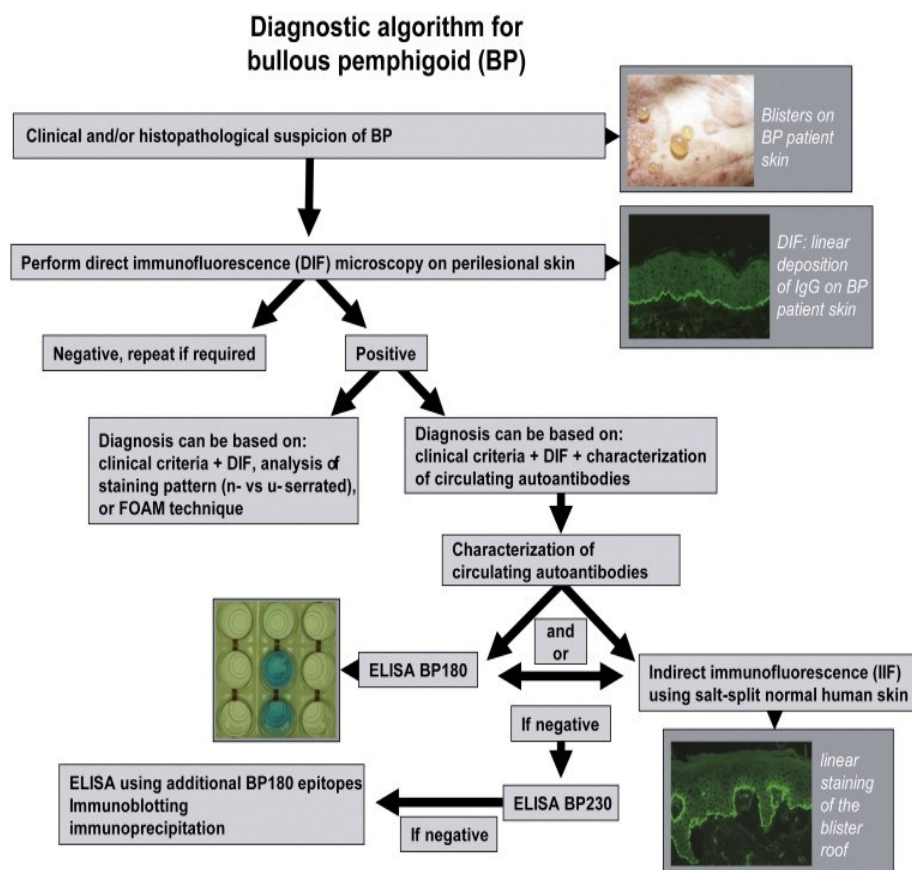


Figura 12 - Algoritmo diagnostico per il pemfigoide bolloso

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

-Biopsia

A livello istopatologico, in un paziente affetto da PB, è possibile osservare un distacco sub-epidermico, conseguente ai meccanismi prima descritti. Caratteristica è inoltre la presenza di un infiltrato dermico di tipo eosinofilo; più raramente si osserva un infiltrato neutrofilo. Neutrofili ed eosinofili si riscontrano anche all'interno della bolla, assieme a fibrina. Nei pazienti affetti da una forma non bollosa, si evidenzia invece la presenza di spongiosi eosinofila [73] [74].

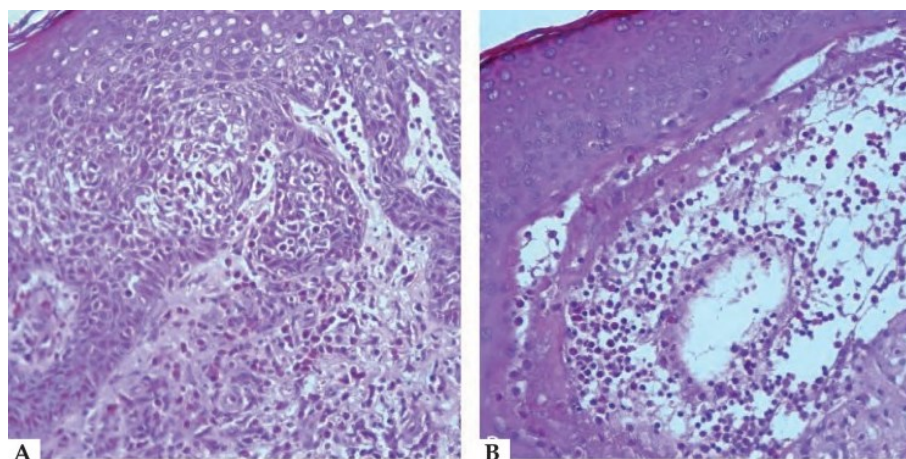


Figura 13 – Caratteristiche istopatologiche del pemfigoide bolloso: Spongiosi eosinofila con infiltrato dermico eosinofilo (ematossilina e eosina, x20) (A); distacco subepidermico con eosinofili e fibrina (ematossilina e eosina, x20) (B)

Tratto da: Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol.* 2019 Mar-Apr;94(2):133-146

-Immunofluorescenza diretta

L'immunofluorescenza diretta è attualmente il gold standard per la diagnosi di PB. Tale tecnica, realizzata su biopsia di cute perilesionale non bollosa, evidenzia la presenza di depositi lineari di IgG e/o di C3, con occasionale riscontro di IgM o IgA, lungo la giunzione dermo-epidermica [75]. Tuttavia tale reperto accomuna tutte le patologie del gruppo del pemfigoide, e non solo il PB; un importante aspetto che distingue l'epidermolisi bollosa acquisita dalle altre patologie del gruppo del pemfigoide sta nella differente morfologia dei depositi di IgG a livello della giunzione dermo-epidermica; infatti nel caso dell'epidermolisi bollosa acquisita si osserva un pattern a U, mentre negli altri casi si osserva un pattern a N [76].

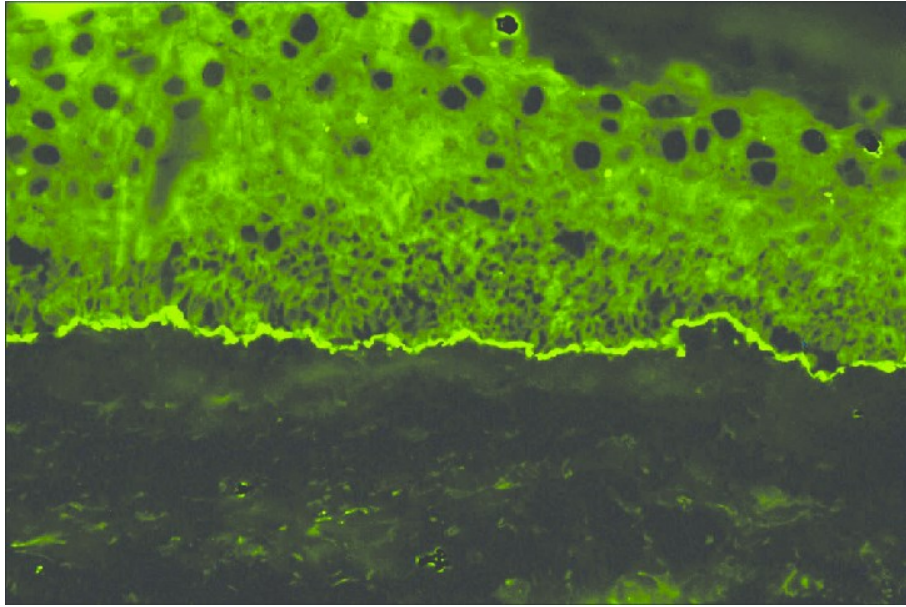


Figura 14 - Immunofluorescenza diretta. Si osservano depositi lineari di C3 a livello della giunzione dermo-epidermica (isotiocianato di fluoresceina anti-C3, x200).

Tratto da: Vijayav M, Shyam Prasad A.L., Role of direct immunofluorescence in dermatological disorders, *Indian Dermatology online J*, 2015 6(3):172

-Immunofluorescenza indiretta

L'immunofluorescenza indiretta sfrutta un substrato di cute umana separata attraverso trattamento con NaCl (tecnica a scissione salina) [77]. L'utilità di tale tecnica sta nel fatto che permette una diagnosi differenziale tra BP e altri dermatosi, quali l'epidermolisi bollosa acquisita e il pemfigoide anti p-200/laminina gamma; infatti nel PB gli anticorpi si fissano a livello del tetto della zona di clivaggio (versante epidermico), mentre nell'epidermolisi bollosa acquisita e nel pemfigoide anti p-200/laminina gamma, si osserva come gli anticorpi si fissino sul pavimento (versante dermico) [78].

-ELISA

La quantificazione degli anticorpi sierici anti-BP180 e anti-BP-230 mediante ELISA viene svolta di routine nella diagnosi di BP [79].

Tale test infatti, in virtù di una sensibilità dell'85% e specificità del 95% è un'affidabile metodica diagnostica, il cui utilizzo è recentemente aumentato [80].

I test ELISA attualmente in commercio permettono di ricercare anticorpi IgG o IgE (questi ultimi solo molto recentemente) rivolti contro il dominio NC16A della proteina BP180; non sono stati ancora realizzati test che permettano il riconoscimento di anticorpi IgA [81] [82][83].

È possibile anche ricercare anticorpi IgG anti BP230; tipicamente prima si esegue il dosaggio degli IgG anti BP180, poi, se risultati negativi, si ricercano gli IgG anti BP230 [84].

1.3.7 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

In virtù della presentazione polimorfa del PB, che spazia da lesione bollose a lesione non bollose, come prima descritto, va considerata una vasta gamma di diagnosi differenziali: pemfigo foliaceo, pemfigo erpetiforme, dermatosi bollosa a IgA lineare, epidermolisi bollosa acquisita, lupus eritematoso bolloso, eczema, orticaria, prurigo, impetigine, eritema multiforme, sindrome di Sweet, necrolisi epidermica tossica e prurito autotossico [85].

1.3.8 PROGnosi

I fattori di rischio correlati all'aumento della mortalità nel BP includono l'età avanzata, i disturbi neurologici e l'aumento dei livelli sierici di IgG anti-BP180 NC16A [86] [87]. Recenti studi, hanno mostrato come la mortalità a 1 anno sia in media del 23,5%. I tassi di mortalità più elevati sono stati ottenuti in Europa (26,7%), seguita da Asia (20,5%) e Stati Uniti (15,1%), probabilmente legati ad un maggior numero di comorbidità e a un'età più avanzata degli europei rispetto a asiatici e americani [88] [89].

1.3.9 TRATTAMENTO

Tabella I – Trattamenti del pemfigoide bolloso. È riassunto il trattamento evidence-based del pemfigoide, in relazione alla gravità della patologia; si riportano i livelli di evidenza proposti dal Centre for Evidence-Based Medicine, Oxford [90] [91] [92].

<i>First-line treatment</i>			
Medication	Dose	BP severity	Level of evidence
High-potency topical steroid (0.05% clobetasol cream)	10-30g/day topical	mild to moderate	1A
Systemic steroid (prednisone)	0.5-1.0mg/kg/day PO	moderate to severe	1A

Second-line treatment			
Doxycycline (> 12 y)	100mg BID PO	mild to moderate	1B
Dapsone	Adult: 100mg/day PO Children 0.5-2.0mg/kg/day PO	mild to moderate	1B
Methotrexate	15mg/week PO	moderate to severe	3B
Azathioprine	0.5-2.0mg/kg/day PO	moderate to severe	1B
Mycophenolate mofetil	35-45mg/kg/day PO (up to 3g/day)	moderate to severe	1B
Intravenous immunoglobulin	400mg/kg/day for 5 consecutive days IV	severe	1B
Rituximab	1g on day 1 and day 14 or 375mg/m ² /week for 4 weeks IV	severe	4
Omalizumab	300mg every 2-4 weeks SC	severe	4

Abbreviazioni: BID, twice daily; IV, intravenous; PO, per os; SC, subcutaneous.

Il trattamento del PB è finalizzato a evitare l'insorgenza di nuove lesioni e a consentire la guarigione cutanea e il controllo del prurito.

Poiché il PB colpisce principalmente persone anziane, la scelta della terapia deve essere adattata alle comorbidity e alla capacità di autogestione del paziente, al fine di evitare potenziali complicazioni e un aumento della morbilità e della mortalità.

Tipicamente il clobesol 0,05%, a un dosaggio giornaliero di 10-30 g/die, rappresenta la prima linea di trattamento in pazienti con forme lievi-moderate.

Tuttavia, alcune limitazioni relative all'uso di tale farmaco includono la difficoltà di eseguire auto-applicazioni della crema su tutto il corpo, nonché un peggioramento dell'atrofia cutanea

comunemente osservata nella pelle di pazienti anziani [93]. Per questi motivi, gli steroidi sistemici, secondo alcune linee guida, rimangono il trattamento di prima linea, specie nelle forme severe di PB [94] [95].

In realtà altri studi, hanno dimostrato come la terapia corticosteroidica topica sia efficace sia per il pemfigoide moderato sia per la forma severa, e che rispetto alla terapia sistemica presenti percentuali di sopravvivenza a 1 anno superiori, una risposta più rapida e un minor numero di effetti collaterali [96]. Per la terapia steroidea sistemica si utilizza solitamente prednisone, a un dosaggio 0.5/1 mg/Kg /die.

Vi sono poi tutta una serie di farmaci che possono essere utilizzati nei pazienti resistenti al trattamento con steroidi orale o in associazione a questi, di modo da ridurre la dose [97]:

-Azatioprina (0.5-2.0 mg/kg/die): è un derivato della 6-mercaptopurina che interagisce con il DNA cellulare promuovendo l'apoptosi, l'arresto della proliferazione delle cellule B e la riduzione della sintesi degli anticorpi [98]. Prima di iniziare il trattamento con azatioprina, è necessario controllare il livello di tiopurina metiltrasferasi (TPMT), essendo tale farmaco associato a un importante rischio di mielosoppressione; il dosaggio di azatioprina sarà poi calcolato in base ai livelli di TPMT. Altri potenziali effetti avversi includono tumori, disturbi gastrointestinali e infezioni [99]. Oltre all'azatioprina, altri immunosoppressori utilizzati sono il metotrexate (15 mg a settimana) e il micofenolato mofetile (35-45 mg/kg/die).

-Dapsone: contribuisce a un miglioramento clinico poiché inibisce la chemiotassi e l'attivazione dei neutrofili, riducendo il rilascio di leucotrieni e prostaglandine [100].

-Doxiciclina: tetraciclina dotata di un effetto infiammatorio non associato a forte immunosoppressione. Un recente studio ha dimostrato una non-inferiorità della doxiciclina a un dosaggio di 200mg/giorno nel raggiungere il controllo della malattia dopo 6 settimane di trattamento rispetto al prednisolone 0.5mg/kg/giorno, con analogo miglioramento della qualità di vita. I pazienti che hanno assunto doxiciclina hanno subito meno effetti avversi con una diminuzione del rischio di morte [101].

-Immunoglobuline ev: occasionalmente utilizzate nel trattamento del BP; determinano una riduzione degli IgG anti-BP180 e delle citochine infiammatorie IL-1 e IL-6; favoriscono altresì l'incremento dei livelli di IL-10, con effetto antinfiammatorio [102] [103].

-Rituximab: anticorpo monoclonale il cui meccanismo d'azione si basa sulla deplezione di linfociti B attraverso legame con i recettori CD20 espressi da queste cellule; in questo contesto la sua utilità è data da una riduzione dei livelli di anticorpi anti-BP180 [104] [105].

-Omalizumab: anticorpo monoclonale che si lega alle IgE circolanti e riduce l'espressione dei loro recettori sulle cellule del sistema immunitario [106]

2. HLA-DQ

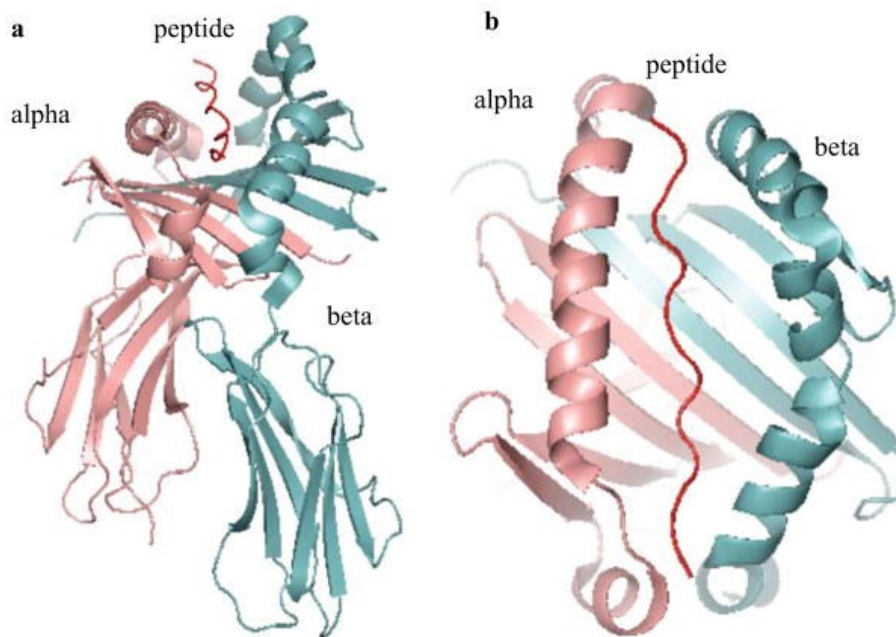


Figura 15- Struttura tridimensionale del complesso MHC II.

Tratto da: Painter, Corrie A, and Lawrence J Stern. "Structural Insights Into HLA-DM Mediated MHC II Peptide Exchange." *Current topics in biochemical research* vol. 13,2 (2011): 39-55

HLA-DQ è un recettore di membrana del complesso MHC II presente sulle cellule APC (macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B); si localizza nel braccio corto del cromosoma 6, regione 21.3, ed è un eterodimero costituito da due subunità, alfa e beta; nello specifico, la subunità alfa è codificata dal gene HLA-DQA1, mentre la subunità beta è codificata dal gene HLA-DQB1. Tale locus è inoltre vicino, e dunque strettamente collegato al locus HLA-DR.

Il ruolo degli aplotipi HLA-DQ è stato in particolar modo oggetto di studio nel contesto della celiachia; pochi dati si hanno invece in letteratura circa un'associazione tra gli aplotipi in questione e altre patologie di tipo autoimmune.

Nello specifico, è stato appurato come quasi tutti i pazienti affetti da celiachia presentino gli aplotipi HLA -DQA2 e HLA -DQB8, codificati appunto dai geni HLA-DQA1 e HLA-DQB1 [107]; Circa il 95% dei pazienti affetti da celiachia esprime HLA-DQ2, le cui catene alfa e beta sono codificate rispettivamente dai geni DQA1*05 and DQB1*02, mentre la restante parte tipicamente presenta HLA-DQ8, le cui catene sono invece codificate dagli alleli DQA1*0301 e DQB1*0201 [108].

La presenza di questi alleli tuttavia è condizione necessaria, ma non sufficiente per lo sviluppo della patologia: infatti, l'allele HLA-DQ2 è comune nella popolazione caucasica, con una frequenza del 30%, ma solo il 3% svilupperà celiachia [109] [110]. Nel complesso, la percentuale di rischio di sviluppo di morbo celiaco nei pazienti portatori è compreso tra il 36 e il 53% [111].

Questi risultati si spiegano analizzando il ruolo delle cellule APC DQ2/8+ nella genesi della celiachia: tali cellule sono infatti in grado di riconoscere la gliadina deaminata, che viene dunque presentata mediante il sistema HLA ai linfociti CD4+; questi a loro volta favoriscono la maturazione delle cellule B, con conseguente produzione di anticorpi anti-transglutaminasi [112]. Chiaramente, anche la dermatite erpetiforme di Dering, precedente trattata, si caratterizza per una stretta associazione con gli aplotipi HLA-DQ2 e HLA-DQ8, che possono riscontrarsi, rispettivamente, nell'85% e nel 15% dei pazienti affetti [113].

Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio è la valutazione dei geni HLA-DQ in soggetti affetti da PB. Per raggiungere tale scopo è stata valutata la frequenza degli alleli e degli aplotipi HLA-DQA1 e HLA-DQB1 in un campione di individui con diagnosi di PB.

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 52 pazienti, presentanti i seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi di PB: clinicamente sospettata 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 cutanee diversi dal pemfigoide bolloso
- presenza di altre patologie autoimmuni sistemiche

La numerosità campionaria pari a 52 pazienti è dipesa dalla rarità della patologia oggetto di studio, e dal numero di pazienti afferenti presso la clinica dermatologica di Padova.

2. TECNICHE DI LABORATORIO

Per la valutazione degli alleli HLA in pazienti affetti da PB 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 mutazioni per ciascun paziente nonché più pazienti in contemporanea.

Gli alleli genotipizzati nel nostro studio sono i seguenti:

- DQA1*02
- DQA1*03
- DQA1*05
- DQA1*01/*04/*06
- DQA1*02/*03:01
- DQA1*03:02/03
- DQB1*02
- DQB1*03:02
- DQB1*03/*06
- DQB1*04/*05

In breve, l'iter di laboratorio prevede i 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/DQ8-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 posizionarli sotto cappa
2	Rimuovere dal congelatore MIX A, B, C, D e posizionarle in frigo
3	Accendere il termociclatore e preriscaldare il coperchio

PRE-PCR	ESTRAZIONE DEL DNA
1	Scongelare 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 posizionarle 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

3. ANALISI STATISTICA

È stata effettuata un'analisi di tipo descrittivo, utilizzando Excel: in particolare le variabili quantitative sono state espresse come frequenze assolute e relative (percentuali).

Risultati

DQB1	DQA1						DQB1
	02	03	05	01/04/06	03:01	03:02/03	
02	7,6	0	17				21,15
03:02	5,2	7,6	5,7				13,46
03/06							92,31
04/05							28,85
DQA1	11,54	11,54	82,69	44,23	19,23	3,85	

Non è disponibile un gruppo di controllo appartenente alla stessa popolazione del campione in esame; pertanto, si riportano di seguito le frequenze degli alleli disponibili in letteratura relative a un campione di soggetti sani di etnia caucasica. I dati di seguito presentati sono tratti nello specifico dallo studio “*New HLA haplotype frequency reference standards: High-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans*” condotto da W. Klitz et al.

Frequency % of DQA1-DQB1 haplotypes from 1,899 European Americans

DQB1	DQA1									DQB1 frequencie	
	0101	0102	0103	0104	0201	0301	0302	0401	0501		0601
0201									13.16		13.16
0202					11.08		0.08				11.16
0301					0.05	0.16	6.45	0.03	11.06	0.11	17.85
0302						9.62	0.93				10.53
0303					3.66		0.79				4.45
0304						0.09	0.09		0.03		0.21
0305						0.16					0.16
0402						0.03	0.11	2.26			2.40
0501	10.85	0.03	0.03	0.71							11.61
0502		1.29									1.29
0503			0.05	2.03							2.08
0504		0.08									0.08
0601			0.66								0.66
0602		14.27	0.03	0.03							14.32
0603		0.27	5.66								5.92
0604		3.40									3.40
0609		0.71									0.71
DQA1	10.85	20.04	6.42	2.76	14.80	10.03	8.45	2.29	24.25	0.11	100.00

frequencies

Discussione

Gli alleli HLA-DQA1 e HLA-DQB1 sono stati studiati in condizioni di pertinenza dermatologica diverse dalla dermatite erpetiforme, di seguito approfondite:

-Pemfigo volgare e foliaceo

In merito all'associazione tra i geni HLA-DQA1 e HLA-DQB1 e PF/PV, si riporta uno studio italiano, condotto da Fania L. et al. in cui sono state analizzate due coppie di fratelli di due famiglie italiane, non imparentate, e affette da PV.

Nella famiglia A, i due pazienti con PV avevano lo stesso profilo genetico HLA: HLA-DQA1 *01:04/*03:01, HLA-DQB1 *03:02/*05:03 e HLA-DRB1 *04:02/*14:01.

Anche nella famiglia B, i due pazienti con PV presentavano lo stesso genotipo HLA: HLA-DQA1 *03:01/*05:08, HLA-DQB1 *03:01/*03:03 e HLA-DRB1 *04:02/*11:01. Lo studio ha dunque mostrato la sussistenza di un'associazione tra il profilo *HLA* e la presenza di PV nelle famiglie italiane studiate: infatti, nella famiglia A, tutti e sei gli alleli sono frequentemente associati al PV, mentre nella famiglia B, due dei sei alleli sono spesso associati al PV [114].

In uno studio condotto invece da Walsh P. et al, è stata valutata l'associazione tra pemfigo e leishmaniosi cutanea americana: è emerso dunque che HLA-DQA1*01 è un allele protettivo per la leishmaniosi, mentre si associa a un maggior rischio di sviluppo di pemfigo; in relazione a HLA-DQA1*01:02 sono stati ottenuti risultati opposti, quindi questo rappresenta un fattore di rischio per leishmaniosi e un fattore protettivo per pemfigo [115].

Ancora, si cita uno studio condotto da Brochado MJ, in cui è stato dimostrato che gli alleli HLA-A*11, 33, -B*14; -DRB1*01:01, *01:02; -DQA1*01:02; e -DQB1*05:01 predispongono allo sviluppo di PF, mentre gli alleli HLA-B*38; -C*12; -DRB1*04:02, *08:04, *14:01, *14:04; -DQA1*03:01; e -DQB1*03:02 and *05:03 favoriscono l'insorgenza di PV [116]. Medesime conclusioni si possono osservare nello studio condotto da S.Shams et al, in cui è stata dimostrata un'associazione tra l'insorgenza di PV in pazienti iraniani non ebrei e gli alleli HLA-DRB1*04, -DRB1*1401, -DRB4, -DQA1*0104, -DQA1*03011, -DQB1*0302, and -DQB1*0502 [117]. Nello studio condotto invece da Iino et al, si è osservato come gli alleli HLA-A*02011, -A*2402101, -DQA1*0104, -DQB1*05031 and -DRB1*1405 rappresentassero degli importanti elementi di predisposizione per lo sviluppo di PV [118]. Si citano infine due ultimi studi: il primo, condotto da Lee CW et al. in cui è stato dimostrato come gli alleli DRB1*01, DQA1*0302 e DQB1*0603 rappresentino fattori di rischio per lo sviluppo di PV [119], il secondo, condotto da Niizeki H. et al.,

in cui è stato evidenziato che l'allele DQB1*0503 rappresenta un fattore di rischio per PV, contrariamente agli alleli DQA1*0103 or DQB1*0601, per cui non si evidenzia associazione [120].

-Melanoma

Circa la presenza di un'associazione tra melanoma e HLA, si cita anzitutto uno studio condotto da Roldan-Marin R. et al., in cui è stato dimostrato che gli alleli HLA-DQB1*02:02 e HLA-DQA*01:03 si associano a un aumento della probabilità di sviluppo di melanoma acrale lentiginoso nei Messicani. [121] Si riporta inoltre uno studio giapponese condotto da Kageshita T et al., da cui è emerso come la frequenza di HLA-DQB1*0302 sia aumentata in pazienti giapponesi affetti da melanoma, mentre quelle HLA-DQA1*0101(04) e HLA-DQA1*0401 siano diminuite. È stato infine osservato che, in pazienti con melanoma lentiginoso acrale, HLA-DQA1*0103 rappresenti un fattore predisponente. [122]

Per quanto riguarda il PB, si rcontra un unico studio in letteratura, svolto su una popolazione europea e pubblicato nel 2021.

-Pemfigoide bolloso

Si cita nello specifico un recente studio inglese, pubblicato nel maggio del 2021 che ha dimostrato la sussistenza di un'associazione tra gli alleli HLA-DQA1*05:05 e HLA-DRB1*07:01 e lo sviluppo PB nei tedeschi [123].

I risultati di tale studio sono in linea con quelli riportati da studi precedenti; infatti, l'allele HLA-DQA1*05:05 era già stato identificato come fattore predisponente allo sviluppo di BP in Brasiliani [124] e Cinesi [125], mentre l'allele HLA-DRB1*07:01 era stato identificato come fattore protettivo circa lo sviluppo di BP in Cinesi. [125]

I nostri risultati, in accordo con lo studio appena citato, hanno evidenziato una frequenza elevata dell'allele DQA1*05, pari all'82,69% in pazienti caucasici affetti da PB. Si ricorda invece come la frequenza di tale allele nella popolazione generale, riportando i dati presenti in letteratura, sia solo del 24,25%. I nostri risultati suggeriscono quindi una differenza di frequenza dell'allele nei soggetti con PB; inoltre, l'aplotipo HLA-DQA1*05/DQB1*02 nel nostro studio compare con una frequenza del 17%, mentre in letteratura, sempre in riferimento alla popolazione generale, la frequenza del medesimo aplotipo è del 13%.

Si sottolinea come la principale limitazione del nostro studio sia, oltre alla limitata numerosità campionaria, l'assenza di un campione di controllo per evidenziare differenze statistiche nelle distribuzioni della frequenza, il quale è stato dunque preso dalla letteratura.

Conclusioni

In conclusione, i nostri risultati hanno evidenziato un'elevata frequenza dell'allele HLA-DQA1*05 nel campione di pazienti caucasici affetti da PB esaminato.

Alla luce dei risultati incoraggianti di questa esperienza iniziale, auspichiamo di poter confermare queste osservazioni su un campione più numeroso e di poter raccogliere un gruppo di controllo di soggetti sani proveniente dalla stessa area geografica.

Bibliografia

1. Egami S, Yamagami J, Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Apr;145(4):1031-1047
2. Kridin K, Schmidt E. Epidemiology of Pemphigus. *JID Innov*. 2021 Feb 20;1(1):100004
3. Malik AM, Tupchong S, Huang S, Are A, Hsu S, Motaparathi K. An Updated Review of Pemphigus Diseases. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 9;57(10):1080
4. Lotti R, Shu E, Petrachi T, Marconi A, Palazzo E, Quadri M, Lin A, O'Reilly LA, Pincelli C. Soluble Fas Ligand Is Essential for Blister Formation in Pemphigus. *Front Immunol*
5. Schmidt E, Waschke J. Apoptosis in pemphigus. *Autoimmun Rev*. 2009 Jun;8(7):533-7.
6. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9(10):844–57
7. Maity S, Banerjee I, Sinha R, Jha H, Ghosh P, Mustafi S. Nikolsky's sign: A pathognomic boon. *J Family Med Prim Care*. 2020 Feb 28;9(2):526-530
8. James KA, Culton DA, Diaz LA. Diagnosis and clinical features of pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin*. 2011 Jul;29(3):405-12, viii.
9. Santoro FA, Stoopler ET, Werth VP. Pemphigus. *Dent Clin North Am*. 2013 Oct;57(4):597-610
10. Van ATT, Nguyen TV, Huu SN, Thi LP, Minh PPT, Huu N, Cam VT, Huyen ML, Nguyet MV, Hau KT, Gandolfi M, Satolli F, Feliciani C, Tirant M, Vojvodic A, Lotti T. Improving Treatment Outcome of Pemphigus Vulgaris on Vietnamese Patients by Using Desmoglein Elisa Test. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Jan 22;7(2):195-197
11. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 May 11;3:17026
12. Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazhooch M, Valikhani M, Balighi K, Hallaji Z, Barzegari M, Akhyani M, Ghodsi SZ, Seirafi H, Nazemi M-JT, Mortazavi H, Mirshams-Shahshahani M. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. ottobre 2007;57(4):622–8.
13. Melchionda V, Harman KE. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: an overview of the clinical presentation, investigations and management. *Clin Exp Dermatol*. 2019;44(7):740–6.
14. Chen DM, Oduyungbo A, Csinady E, Gearhart L, Lehane P, Cheu M, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, Caillot F, Golinski ML, Labeille B, Picard-Dahan C, Paul C, Richard MA, Bouaziz JD, Duvert-Lehembre S, Bernard P, Caux F, Alexandre M, Ingen-

- Housz-Oro S, Vabres P, Delaporte E, Quereux G, Dupuy A, Debarbieux S, Avenel-Audran M, D'Incan M, Bedane C, Bénétou N, Jullien D, Dupin N, Misery L, Machet L, Beylot-Barry M, Dereure O, Sassolas B, Benichou J, Musette P, Joly P; French Study Group on Autoimmune Bullous Diseases. Rituximab is an effective treatment in patients with pemphigus vulgaris and demonstrates a steroid-sparing effect. *Br J Dermatol*. 2020 May;182(5):1111-1119
15. Xu HH, Werth VP, Parisi E, Sollecito TP. Mucous membrane pemphigoid. *Dent Clin North Am*. 2013 Oct;57(4):611-30
 16. Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, Vaughan RW, Kaneko F, Challacombe SJ, Black MM. 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.
 17. Huilaja L, Mäkikallio K, Tasanen K. Gestational pemphigoid. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Sep 2;9:136
 18. Gupta R, Woodley DT, Chen M. Epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Dermatol*. 2012 Jan-Feb;30(1):60-9
 19. Vorobyev A, Ludwig RJ, Schmidt E. Clinical features and diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *Expert Rev Clin Immunol*. 1 febbraio 2017;13(2):157–69.
 20. Juratli HA, Sárdy M. Lineare IgA-Dermatose [Linear IgA bullous dermatosis]. *Hautarzt*. 2019 Apr;70(4):254-259
 21. Reunala T, Hervonen K, Salmi T. Dermatitis Herpetiformis: An Update on Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*. 2021 May;22(3):329-338
 22. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol*. (1995) 131:48–52.
 23. Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trüeb RM, et al. . Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol*. (2009) 161:861–8.
 24. Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, et al. . Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol*. (2012) 132:1998–2004.
 25. Bertram F, Bröcker E-B, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*. (2009) 7:434–40.
 26. Kridin K, Ludwig RJ. The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:220. Published 2018 Aug 20.

27. Moro F, Fania L, Sinagra JLM, Salemme A, Di Zenzo G. Bullous Pemphigoid: Trigger and Predisposing Factors. *Biomolecules*. 2020 Oct 10;10(10):1432
28. Drago F., Nozza P., Casazza S., Brusati C., Bandelloni R., Rebora A. Human herpesviruses in bullous pemphigoid lesions. *Br. J. Dermatol.* 2005;152:375–376
29. Jang H., Jin Y.-J., Yoon C.H., Kim C.-W., Kim L. Bullous pemphigoid associated with chronic hepatitis C virus infection in a hepatitis B virus endemic area: A case report. *Medicine*. 2018;97:e0377
30. Sagi L., Baum S., Agmon-Levin N., Sherer Y., Katz B.S.P., Barzilai O., Ram M., Bizzaro N., Sanmarco M., Trau H., et al. Autoimmune bullous diseases. The spectrum of infectious agent antibodies and review of the literature. *Autoimmun. Rev.* 2011;10:527–535
31. Mai Y., Nishie W., Sato K., Hotta M., Izumi K., Ito K., Hosokawa K., Shimizu H. Bullous Pemphigoid Triggered by Thermal Burn Under Medication With a Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor: A Case Report and Review of the Literature. *Front. Immunol.* 2018;9
32. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JWC, et al. . Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev.* (2011) 10:733–43. 10.1016/j.autrev.2011.05.002
33. Marzano AV, Trevisan V, Eller-Vainicher C, Cairolì E, Marchese L, Morelli V, et al. . Evidence for vitamin D deficiency and increased prevalence of fractures in autoimmune bullous skin diseases. *Br J Dermatol.* (2012) 167:688–91.
34. Marzano AV, Trevisan V, Cairolì E, Eller-Vainicher C, Morelli V, Spada A, et al. . Vitamin D and skeletal health in autoimmune bullous skin diseases: a case control study. *Orphanet J Rare Dis.* (2015) 10:1–7
35. Langan S.M., Groves R.W., West J. The Relationship between Neurological Disease and Bullous Pemphigoid: A Population-Based Case–Control Study. *J. Investig. Dermatol.* 2011;131:631–636
36. Jeon H.W., Yun S.J., Lee S.-C., Won Y.H., Lee J.-B. Mortality and Comorbidity Profiles of Patients with Bullous Pemphigoid in Korea. *Ann. Dermatol.* 2018;30
37. Chen Y., Wu C., Lin M.J., Chen T., Liao K., Hwang C., Chu S., Chen C., Lee D., Chang Y.-T., et al. Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: A nationwide population-based study. *Br. J. Dermatol.* 2011;165:593–599
38. Oh D., Zhao C., Murrell D. A review of case-control studies on the risk factors for the development of autoimmune blistering diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2015;30:595–603
39. Lai Y., Yew Y., Lambert W. Bullous pemphigoid and its association with neurological diseases: A systematic review and meta-analysis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2016;30:2007–2015.

40. Callen J.P. Internal disorders associated with bullous disease of the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1980;3:107–119
41. Dahl M.V. Bullous pemphigoid: Associated diseases. *Clin. Dermatol.* 1987;5:64–70.
42. Person J.R., Rogers R.S. Benign: Bullous and cicatricial pemphigoid, clinical, histopathologic and immunopathologic correlations. *Plast. Reconstr. Surg.* 1977;60:486
43. Ohata C., Ishii N., Koga H., Fukuda S., Tateishi C., Tsuruta D., Furumura M., Hashimoto T. Coexistence of autoimmune bullous diseases (AIBDs) and psoriasis: A series of 145 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2015;73:50–55.
44. Dainichi T., Kabashima K. Interaction of Psoriasis and Bullous Diseases. *Front. Med.* 2018;5
45. Schulze F, Neumann K, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Malignancies in Pemphigus and Pemphigoid Diseases. *J Invest Dermatol.* 1 maggio 2015;135(5):1445–7.
46. Balestri R, Magnano M, Placa ML, Patrizi A, Angileri L, Tengattini V, Bardazzi F. Malignancies in bullous pemphigoid: A controversial association. *J Dermatol.* 2016;43(2):125–33.
47. Bech R., Kibsgaard L., Vestergaard C. Comorbidities and Treatment Strategies in Bullous Pemphigoid: An Appraisal of the Existing Literature. *Front. Med.* 2018;5
48. Yan T.M., Zuo Y.G. Coagulation Disorders in Bullous Pemphigoid and Its Mechanism. *Acta Acad. Med. Sin.* 2019;41:685–689
49. Roujeau J.-C., Lok C., Bastuji-Garin S., Mhalla S., Enginger V., Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch. Dermatol.* 1998;134:465–469
50. Echigo T., Hasegawa M., Inaoki M., Yamazaki M., Sato S., Takehara K. Antiphospholipid antibodies in patients with autoimmune blistering disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007;57:397–400
51. Marzano A.V., Tedeschi A., Polloni I., Crosti C., Cugno M. Prothrombotic state and impaired fibrinolysis in bullous pemphigoid, the most frequent autoimmune blistering disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2012;171:76–81
52. Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, Caccavale S, Ruocco V, Wolf R. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. *Clin Dermatol.* (2013) 31:391–9.
53. Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T, et al. . Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* (2011) 20:1022–4
54. Hashimoto T, Takahashi H, Sakaguchi S. Regulatory T-cell deficiency and autoimmune skin disease: beyond the scurfy mouse and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* (2018) 142:1754–6

55. Shlomchik MJ. Activating systemic autoimmunity: B's, T's, and tolls. *Curr Opin Immunol.* (2009) 21:626–33
56. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour JP, et al. . Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol.* (2011) 131:2271–80.
57. Fairley JA, Bream M, Fullenkamp C, Syrbu S, Chen M, Messingham KN. Missing the target: characterization of bullous pemphigoid patients who are negative using the BP180 enzyme-linked immunosorbant assay. *J Am Acad Dermatol.* (2013) 68:395–403. 10.1016/j.jaad.2012.09.012
58. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet.* 2013;381:320–332
59. Dainichi T, Nishie W, Yamagami Y, Sonobe H, Ujiie H, Kaku Y, et al. . Bullous pemphigoid suggestive of complement-independent blister formation with anti-BP180 IgG4 autoantibodies. *Br J Dermatol.* (2016) 175:187–90.
60. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, et al. . The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* (1995) 95:1539–44. 10.1172/JCI117826
61. Simon D, Borradori L, Simon HU. Eosinophils as putative therapeutic targets in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* (2017) 26:1187–92
62. de Graauw E, Sitaru C, Horn M, Borradori L, Yousefi S, Simon HU, et al. . Evidence for a role of eosinophils in blister formation in bullous pemphigoid. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* (2017) 72:1105–13
63. Lin L, Hwang BJ, Culton DA, Li N, Burette S, Koller BH, et al. . Eosinophils mediate tissue injury in the autoimmune skin disease bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* (2018) 138:1032–43
64. Rüdrieh U, Gehring M, Papakonstantinou E, Illerhaus A, Engmann J, Kapp A, et al. . Eosinophils are a major source of interleukin-31 in bullous pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* (2018) 98:766–71
65. Marzano AV, Tedeschi A, Fanoni D, Bonanni E, Venegoni L, Berti E, et al. . Activation of blood coagulation in bullous pemphigoid: Role of eosinophils, and local and systemic implications. *Br J Dermatol.* (2009) 160:266–72.
66. Chen R, Ning G, Zhao M-L, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z, Liu Z. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 15 ottobre 2001;108(8):1151–8.
67. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker E-B, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal–epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol.* 2004;204(5):519–27.

68. 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.* 2013 Mar 20;5(1):84–87
69. Lamberts A, Meijer JM, Jonkman MF. Nonbullous pemphigoid: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78:989–995
70. Miyamoto D, Batista DI, Santi CG, Maruta CW, Delgado L, Aoki V. Exfoliative erythroderma as a clinical manifestation of autoimmune bullous diseases. *Int J Dermatol.* 2016;55:e112–e114
71. 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.* 2008;58:41–48
72. Voltan E, Maeda JY, Muniz Silva MA, Maruta CW, Santi CG, et al. Childhood bullous pemphigoid: report of three cases. *J Dermatol.* 2005;32:387–392
73. Lamberts A, Meijer JM, Jonkman MF. Nonbullous pemphigoid: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78:989–995
74. Miyamoto D., Santi C.G., Aoki V., Maruta C.W. Bullous pemphigoid. *An. Bras. Dermatol.* 2019;94:133–146. doi: 10.1590/abd1806-4841.20199007
75. Elder D.E. *Atlas and Synopsis of Levers Histopathology of the Skin.* Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2013
76. Terra JB, Meijer JM, Jonkman MF, Diercks GFH. The n- vs. u-serration is a learnable criterion to differentiate pemphigoid from epidermolysis bullosa acquisita in direct immunofluorescence serration pattern analysis. *Br J Dermatol.* luglio 2013;169(1):100–5.
77. 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.
78. Jindal A., Rao R., Bhogal B.S. Advanced Diagnostic Techniques in Autoimmune Bullous Diseases. *Indian J. Dermatol.* 2017;62:268–278.
79. Keller J.J., Kittridge A.L., Debanne S.M., Korman N.J. Evaluation of ELISA testing for BP180 and BP230 as a diagnostic modality for bullous pemphigoid: A clinical experience. *Arch. Dermatol. Res.* 2016;308:269–272
80. Muglia C, Bronsnick T, Kirkorian AY, Cha J. Questioning the specificity and sensitivity of ELISA for bullous pemphigoid diagnosis. *Cutis.* 2017 Jan;99(1):E27-E30
81. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2002;30:224–232

82. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour J, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol.* 2008;**128**:415–426
83. Iwata Y, Komura K, Koder M, Usuda T, Yokoyama Y, Hara T, Muroi E, Ogawa F, Takenaka M, Sato S. Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2008;**144**:41–48.
84. Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, Tron F, Joly P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* marzo 2011;**147**(3):293–8.
85. 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.
86. Liu YD, Wang YH, Ye YC, Zhao WL, Li L. Prognostic factors for mortality in patients with bullous pemphigoid: a meta-analysis. *Arch Dermatol Res.* 2017;**309**:335–347
87. Holtsche MM, Goletz S, van Beek N, Zillikens D, Benoit S, Harman K, et al. Prospective study in bullous pemphigoid: association of high serum anti-BP180 IgG levels with increased mortality and reduced Karnofsky score. *Br J Dermatol.* 2018;**179**:918–924
88. Sticherling M, Franke A, Aberer E, Gläser R, Hertl M, Pfeiffer C, et al. An open, multicentre, randomized clinical study in patients with bullous pemphigoid comparing methylprednisolone and azathioprine with methylprednisolone and dapsone. *Br J Dermatol.* 2017;**177**:1299–1305
89. Williams HC, Wojnarowska F, Kirtschig G, Mason J, Godec TR, Schmidt E, et al. Doxycycline versus prednisolone as an initial treatment strategy for bullous pemphigoid: a pragmatic, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;**389**:1630–1638
90. Kirtschig G, Middleton P, Bennett C, Murrell DF, Wojnarowska F, Khumalo NP. Interventions for bullous pemphigoid. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010:CD002292
91. Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, et al. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;**13**:833–844
92. Feliciani C, Joly P, Jonkman MF, Zambruno G, Zillikens D, Ioannides D, et al. Management of bullous pemphigoid: the European Dermatology Forum consensus in collaboration with the European Academy of Dermatology and Venereology. *Br J Dermatol.* 2015;**172**:867–877
93. Fontaine J, Joly P, Roujeau JC. Treatment of bullous pemphigoid. *J Dermatol.* 2003;**30**:83–90

94. Venning VA, Taghipour K, Mohd Mustapa MF, Highet AS, Kirtschig G. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of bullous pemphigoid 2012. *Br J Dermatol.* 2012;167:1200–1214
95. Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, et al. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13:833–844
96. Joly P, Roujeau J-C, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, Vaillant L, D'Incan M, Plantin P, Bedane C, Young P, Bernard P, Bullous Diseases French Study Group. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med.* 31 gennaio 2002;346(5):321–7.
97. Kirtschig G, Middleton P, Bennett C, Murrell DF, Wojnarowska F, Khumalo NP. Interventions for bullous pemphigoid. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010:CD002292
98. Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, et al. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13:833–844
99. Meurer M. Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clin Dermatol.* 2012;30:78–83
100. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Bröcker EB, Zillikens D. The IL-8 release from cultured human keratinocytes, mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180, is inhibited by dapsone. *Clin Exp Immunol.* 2001;124:157–162
101. Williams HC, Wojnarowska F, Kirtschig G, Mason J, Godec TR, Schmidt E, et al. Doxycycline versus prednisolone as an initial treatment strategy for bullous pemphigoid: a pragmatic, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;389:1630–1638
102. Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA, et al. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest.* 2005;115:3440–3450
103. Li N, Culton D, Diaz LA, Liu Z. Modes of Action of Intravenous Immunoglobulin in Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2018;138:1249–1251
104. Johnson P, Glennie M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin Oncol.* 2003;30(Suppl 2):3–8
105. Ronaghy A, Streilein RD, Hall 3rd RP. Rituximab decreases without preference all subclasses of IgG anti-BP180 autoantibodies in refractory bullous pemphigoid (BP) *J Dermatol Sci.* 2014;74:93–94
106. Holgate S, Smith N, Massanari M, Jimenez P. Effects of omalizumab on markers of inflammation in patients with allergic asthma. *Allergy.* 2009;64:1728–1736

107. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: Results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003;64:469–77
108. Sciurti M, Fornaroli F, Gaiani F, Bonaguri C, Leandro G, Di Mario F, De' Angelis GL. Genetic susceptibility and celiac disease: what role do HLA haplotypes play? *Acta Biomed*. 2018 Dec 17;89(9-S):17-21.
109. Sollid LM, Markussen G, Ek J, et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*. 1989;169:345–50
110. Liu E, Rewers M, Eisenbarth GS. Genetic testing: Who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease? *Gastroenterology*. 2005;128:S33–7
111. Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet*. 1997;61:307–17
112. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 2019 Jul 23;17(1):142.
113. Spurkland A, Ingvarsson G, Falk ES, Knutsen I, Sollid LM, Thorsby E. Dermatitis herpetiformis and celiac disease are both primarily associated with the HLA-DQ (alpha 1*0501, beta 1*02) or the HLA-DQ (alpha 1*03, beta 1*0302) heterodimers. *Tissue Antigens*. (1997) 49:29–34
114. Fania L, Moro F, De Paolis E, Provini A, Saleme A, Mariotti F, Sinagra JLM, Mazzanti C, Ruzzi L, Capoluongo E, Di Zenzo G. Pemphigus vulgaris in two pairs of siblings from two unrelated Italian families: Human leukocyte antigen genotypes, ST18 mutation and immunological profile. *J Dermatol*. 2021 Feb;48(2):211-214
115. Walsh P, Brochado MJF, Vernal S, Machado AR, Turatti A, de Paula NA, Donadi EA, Roselino AM. Relationship between pemphigus and American tegumentary leishmaniasis: insights from serological and genetic profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2017 Aug 1;111(8):345-353
116. Brochado MJ, Nascimento DF, Campos W, Deghaide NH, Donadi EA, Roselino AM. Differential HLA class I and class II associations in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris patients from a prevalent Southeastern Brazilian region. *J Autoimmun*. 2016 Aug;72:19-24
117. Shams S, Amirzargar AA, Yousefi M, Rezaei N, Solgi G, Khosravi F, Ansaripour B, Moradi B, Nikbin B. HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Immunol*. 2009 Mar;29(2):175-9
118. Iino Y, Hara H, Suda T, Okada T, Baba S, Suzuki H. Co-existence of pemphigus vulgaris and Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Dermatol*. 2005 Jan-Feb;15(1):40-2. PMID: 15701592

119. Lee CW, Yang HY, Kim SC, Jung JH, Hwang JJ. HLA class II allele associations in Korean patients with pemphigus. *Dermatology*. 1998;197(4):349-52.
120. Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, Nishikawa T. HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method. *Tissue Antigens*. 1994 Oct;44(4):248-51.
121. Roldan-Marin R, Rangel-Gamboa L, Vega-Memije ME, Hernández-Doño S, Ruiz-Gómez D, Granados J. Human leukocyte antigen Class II alleles associated with acral lentiginous melanoma in Mexican Mestizo patients: A case-control study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2021 Dec 28;1-7
122. Kageshita T, Naruse T, Hirai S, Ono T, Horikoshi T, Nakagawa H, Tamaki K, Hayashibe K, Ichihashi M, Nakayama J, Hori Y, Ozawa A, Miyahara M, Ohkido M, Inoko H. Molecular genetic analysis of HLA class II alleles in Japanese patients with melanoma. *Tissue Antigens*. 1997 May;49(5):466-70
123. Schwarm C, Gola D, Holtsche MM, Dieterich A, Bhandari A, Freitag M, Nürnberg P, Toliat M, Lieb W, Wittig M, Franke A, Worm M, Sticherling M, Ehrchen J, Günther C, Gläser R, Peitsch WK, Sárdy M, Eming R, Hertl M, Benoit S, Goebeler M, Pföhler C, Kunz M, Kreuter A, van Beek N, Erdmann J, Busch H, Zillikens D, Sadik CD, Hirose M, König IR, Schmidt E, Ibrahim SM; German AIBD Study Group. Identification of two novel bullous pemphigoid-associated alleles, HLA-DQA1*05:05 and -DRB1*07:01, in Germans. *Orphanet J Rare Dis*. 2021 May 19;16(1):228
124. Chagury AA, Sennes LU, Gil JM, Kalil J, Rodrigues H, Rosales CB, et al. HLA-C*17, DQB1*03:01, DQA1*01:03 and DQA1*05:05 alleles associated to bullous pemphigoid in Brazilian population. *Ann Dermatol*. 2018;30:8–12.
125. Fang H, Shen S, Zheng X, Dang E, Zhang J, Shao S, et al. Association of HLA class I and class II alleles with bullous pemphigoid in Chinese Hans. *J Dermatol Sci*. 2018;89:258–262