

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Microscopía confocal en las enfermedades ampollosas subepidérmicas
autoinmunes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Minia Campos Domínguez

Directores

**Paloma Sánchez-Mateos Rubio
Ricardo Suárez Fernández
Jesús Millán Núñez-Cortés**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**MICROSCOPIA CONFOCAL EN LAS
ENFERMEDADES AMPOLLOSAS
SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Minia Campos Domínguez

Bajo la dirección de los doctores:

Paloma Sánchez-Mateos Rubio

Ricardo Suárez Fernández

Jesús Millán Núñez-Cortés

Madrid, 2015



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



D^a. Paloma Sánchez-Mateos Rubio, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Asociada de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

D. Ricardo Suárez Fernández, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Asociado de Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

D. Jesús Millán Núñez-Cortés, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que Dña. Minia Campos Domínguez, licenciada en Medicina y especialista en Dermatología Médico-Quirúrgica y venereología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado **“MICROSCOPIA CONFOCAL EN LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES”**, dando nuestra conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, tras examinar y revisar los contenidos de dicho trabajo.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Madrid

Fdo.

Fdo.

Fdo.



Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

Este trabajo de investigación fue financiado parcialmente mediante la beca post-MIR concedida por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (Julio 2007).

A Sergio, Martina y Julio
A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Suárez , mi maestro, por enseñarme casi todo lo que sé de Dermatología y Medicina.

A la Dra. Paloma Sánchez-Mateos, por contagiarme su curiosidad y entusiasmo por la ciencia.

Al Dr. Jesús Millán, por su inestimable ayuda para la finalización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Manuel Lecona, por transmitirme la pasión por la Dermatopatología.

A Ana Villanueva, por su continuo apoyo y su amistad incondicional.

A Elena y Verónica, buenas amigas, buenas médicas y mejores personas.

A Isabel y Julia, enfermeras de Inmuno-Oncología, por su trabajo generoso y desinteresado.

A Rafael Samaniego, por las imágenes de microscopía confocal.

A Cristina y Belén por su ayuda en el montaje de las figuras

A todos mis compañeros y amigos del Hospital Gregorio Marañón.

A todas las personas que me han ayudado con los trámites burocráticos y administrativos de esta tesis doctoral

- ÍNDICE	8
- ABREVIATURAS	10
- ÍNDICE DE TABLAS	10
- ÍNDICE DE FIGURAS	11
- RESUMEN EN ESPAÑOL	13
- RESUMEN EN INGLÉS.....	19
- INTRODUCCIÓN	23
- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
- MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
- RESULTADOS.....	81
- DISCUSIÓN	109
- REFERENCIAS	119

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	23
1.1. LA UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA.....	24
1.1.1. Queratinocito basal y lámina lúcida	
1.1.2. Lámina densa	
1.1.3. Sublámina densa	
1.2. LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS AUTOINMUNES.....	34
1.3. LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES.....	35
1.4. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES.....	38
1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS SIN DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS.....	39
1.5.1.Histopatología convencional	
1.5.2.Mapeado de antígenos mediante inmunohistoquímica	
1.5.3.Microscopía electrónica convencional	
1.6.MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CON DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS.....	42
1.6.1.Detección de depósitos autoinmunes en piel	
1.6.1.1.Inmunofluorescencia directa	
1.6.1.1.1.Inmunofluorescencia directa convencional	
1.6.1.1.2.Inmunofluorescencia directa sobre piel separada en NaCl 1M	
1.6.1.2.Inmunomicroscopía electrónica	
1.6.2.Detección de autoanticuerpos en suero	
1.6.2.1. Inmunofluorescencia indirecta	
1.6.2.1.1.Inmunofluorescencia indirecta convencional	
1.6.2.1.2.Inmunofluorescencia indirecta sobre piel separada	
1.6.2.1.3.Inmunofluorescencia indirecta sobre sustratos deficitarios	
1.6.2.1.4.Microscopía inmunoelectrónica indirecta	
1.6.2.2.ELISA	
1.6.2.3.Inmunoblot	
1.6.2.4.Inmunoprecipitación	

1.7.MICROSCOPIA CONFOCAL.....	64
1.7.1.Generalidades	
1.7.2.La microscopía confocal aplicada al diagnóstico clínico	
1.7.3.Diagnóstico de enfermedades ampollasas mediante microscopía confocal	
2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
2.1.HIPÓTESIS	
2.2.OBJETIVOS	
3.MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
3.1.DISEÑO DEL ESTUDIO	
3.2. INCLUSIÓN DE PACIENTES (SUJETOS DEL ESTUDIO):	
3.3. TOMA DE MUESTRAS	
3.4.PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	
3.5.ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	
4.RESULTADOS.....	81
4.1. ESTUDIO PILOTO: PATRONES DE TINCIÓN EN LAS DISTINTAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES	
4.2. ESTUDIO DE UNA SERIE DE PENFIGOIDE AMPOLLOSO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL EN CONDICIONES DE PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL	
4.2.1. Comparación con las técnicas convencionales	
4.2.2. Patrones de marcaje de β 4-integrina en el penfigoide ampolloso	
4.2.3. Patrones de marcaje de colágeno en el penfigoide ampolloso	
4.2.4. Patrones de marcaje de laminina en el penfigoide ampolloso	
4.2.5. Resultados globales del análisis por microscopía confocal de la serie de penfigoide ampolloso	
4.3.ESTUDIO DE UNA SERIE DE DERMATOSIS AMPOLLOSA IgA LINEAL	
4.4.OTRAS POSIBILIDADES DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL	
5.DISCUSIÓN.....	109
6.REFERENCIAS.....	119

ABREVIATURAS

EAA	Epidermólisis ampollosa adquirida
EASA	Enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes
BP230	<i>Bullous pemphigoid 230</i>
BP180	<i>Bullous pemphigoid 180</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
DAIL	Dermatosis ampollosa IgA lineal
FOAM	<i>Fluorescent overlay antigen mapping</i>
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LEA	Lupus eritematoso ampoloso
NC1	<i>Non collagenous 1</i>
NC2	<i>Non collagenous 2</i>
PA	Penfigoide ampoloso

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Listado de las principales enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes con las dianas antigénicas asociadas con cada enfermedad
- Tabla 2.** Patrones de inmunofluorescencia directa convencional y en piel separada de las distintas enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes.
- Tabla 3.** Comparación de los resultados de inmunofluorescencia (IFD) convencional, inmunofluorescencia en piel separada con NaCl y microscopía confocal
- Tabla 4.** Hallazgos de la microscopía confocal en la serie de penfigoide ampoloso
- Tabla 5.** Hallazgos de microscopía confocal en la serie de dermatosis ampollosa IgA lineal

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Imagen de microscopía confocal de la unión dermoepidérmica
Figura 2	Estructuras y proteínas principales de la unión dermoepidérmica
Figura 3	Estructura del colágeno XVII o BP180
Figura 4	Lugares recomendados para la realización de biopsias para estudio convencional (negro) y para inmunofluorescencia (rojo).
Figura 5	Tinción con hematoxilina-eosina de una epidermólisis ampullosa adquirida (EAA) y una dermatosis IgA lineal (DAIL). En ambas se observa un despegamiento subepidérmico y un infiltrado inflamatorio moderado con neutrófilos. La histopatología convencional no distingue unas enfermedades ampullosas subepidérmicas de otras.
Figura 6	Tinción inmunohistoquímica para colágeno IV, que se observa de coloración parda en el suelo del despegamiento patológico en un caso de penfigoide ampuloso.
Figura 7	Fundamento de la inmunofluorescencia. Técnica de marcaje indirecto para inmunofluorescencia directa.
Figura 8	Depósito lineal de IgG en penfigoide ampuloso.
Figura 9	Depósito lineal de IgA en dermatosis IgA lineal
Figura 10	Intenso depósito de C3 en penfigoide ampuloso
Figura 11	Depósito granular de IgA en dermatitis herpetiforme
Figura 12	Inmunofluorescencia directa de piel separada en NaCl 1M: depósito en el lado epidérmico de separación en penfigoide ampuloso
Figura 13	Inmunofluorescencia directa de piel separada en NaCl 1M: depósito en el lado dérmico de separación en epidermólisis ampullosa adquirida
Figura 14	Técnica del ELISA indirecto
Figura 15	a)Esquema de las bases ópticas de la microscopía confocal b)Esquema de un microscopio confocal espectral láser
Figura 16	La microscopía confocal elimina los artefactos debidos a la superposición de estructuras y crea “cortes ópticos” de las muestras estudiadas.
Figura 17	Imagen de un moderno microscopio confocal de barrido de láser
Figura 18	Ejemplo de imagen de colocalización realizada con cuatro marcadores
Figura 19	FOAM mediante microscopía confocal. Estudio de colocalización de $\beta 4$ integrina con depósitos autoinmunes. En EAA se observa una nítida banda verde de IgG situada inferior a la integrina (roja) en consonancia con la situación del colágeno VII. En un caso de penfigoide ampuloso se encuentra colocalización de $\beta 4$ integrina con los depósitos autoinmunes, lo cual concuerda con autoinmunidad contra colágeno XVII.
Figura 20	Imagen tomada por el microscopio confocal sin el uso de láser, en la que se pueden observar la epidermis con sus distintas capas, la unión dermoepidérmica y la dermis.
Figura 21	Imágenes monotincionales correspondientes a la figura anterior. La imagen de grises es útil para orientar la imagen y localizar la epidermis y la dermis.
Figura 22	Diagrama de flujo del estudio
Figura 23	Esquema de los depósitos en el penfigoide ampuloso. Existe una colocalización total con $\beta 4$ -integrina y una colocalización parcial con laminina que se observa como un patrón moteado rojo y verde. El colágeno IV queda situado debajo de los depósitos.
Figura 24	Patrones de depósito y colocalización en un caso típico de penfigoide ampuloso

Figura 25	En la dermatosis ampollosa IgA lineal los depósitos colocalizan en la lámina lúcida con β 4-integrina y laminina, pero con un patrón diferente al penfigoide ampoloso.
Figura 26	En la epidermólisis ampollosa adquirida el nivel de los depósitos (fluorescencia verde) corresponde con la localización del colágeno VII de la sublámina densa.
Figura 27	En la columna izquierda se observa el caso de DAIL. En la DAIL los depósitos de IgA se localizaron por encima del colágeno IV y mostraron colocalización tanto con laminina como con la β 4-integrina. En la columna derecha se muestra el caso de EAA. Los depósitos de IgG se localizaron por debajo del colágeno tipo IV, de la laminina y de la β 4-integrina,
Figura 28	En el lupus eritematoso ampoloso se observa un depósito en la sublámina densa, pero con una cierta colocalización con el colágeno IV
Figura 29	Patrones de depósito y colocalización en un caso típico de lupus eritematoso ampoloso. Los depósitos se sitúan en la parte inferior de la membrana basal.
Figura 30	Ejemplos de colocalización de β 4-integrina con los depósitos autoinmunes en la membrana basal
Figura 31	Imágenes de 4 casos de penfigoide ampoloso en los que se observa una banda amarilla de colocalización entre los depósitos autoinmunes y la β 4-integrina
Figura 32	Caso 187. Colocalización de C3 con β 4-integrina
Figura 33	Imagen correspondiente al mismo caso de la figura 32, en el que se observa que el patrón de colocalización de β 4-integrina con IgG es similar al obtenido con C3, por lo que ambas tinciones tienen el mismo valor diagnóstico.
Figura 34	Patrones de separación del colágeno IV (rojo) de los depósitos autoinmunes (verde) en cuatro casos diferentes de penfigoide ampoloso
Figura 35	Se muestran dos casos en los que se realizaron tanto las tinciones de IgG/colágeno IV como las de C3/colágeno IV. Se observa que los resultados son superponibles.
Figura 36	Imágenes obtenidas en un caso de penfigoide ampoloso cuyo estudio de piel separada en CINA 1M marcaba en el suelo. Al contrario que en los penfigoides ampolosos típicos, se observa una separación de la β 4-integrina y una colocalización con el colágeno IV.
Figura 37	Verde: tinción para IgG. Rojo: tinción para laminina. Derecha: suma de ambas imágenes.
Figura 38	Imagen del caso 177 de dermatosis ampollosa IgA lineal con un patrón de depósito profundo
Figura 39	Análisis gráfico mediante el software del microscopio confocal. En el penfigoide ampoloso se ve una coincidencia del pico de los depósitos de β 4-integrina y C3. En cambio, se ven dos picos separados que corresponden a los depósitos de colágeno IV y C3
Figura 40	Gráficos de puntos elaborados por el software del microscopio confocal. En el caso superior, colágeno IV no colocaliza con C3, por lo que hay una ausencia de puntos en la esquina superior derecha del gráfico de puntos. En el caso inferior, β 4-integrina colocaliza con C3, por lo que la distribución de los puntos sigue una recta y hay una densidad alta de puntos en la esquina superior derecha
Figura 41	Procesamiento de imagen denominado <i>Masked Overlay</i> por el cual el software marca con un color diferente todas las áreas de colocalización. En estos casos, en lugar de observarse una banda amarilla de colocalización de β 4-integrina con IgG se ha elaborado una imagen con una banda brillante blanco-azulada
Figura 42	Imágenes de gran definición de la membrana basal obtenidas mediante CLSM

RESUMEN EN ESPAÑOL

Introducción

Las enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes constituyen un complejo grupo de trastornos cutáneos en cuya patogenia se rompe la unión dermoepidérmica. Su alta morbilidad se debe a la afectación de grandes áreas cutáneas por ampollas, erosiones o cicatrices y a la posible afectación de las mucosas oral, conjuntival, laríngea, esofágica y genitourinaria. Además, se ha demostrado su asociación con enfermedades neurológicas degenerativas y neoplasias.

Existe un gran solapamiento clínico e histológico entre múltiples enfermedades, ya que varios antígenos de la membrana basal pueden estar implicados. En las dos últimas décadas se han producido grandes avances para intentar descubrir todos los antígenos implicados y la posible correlación clínico-inmunológica entre manifestaciones clínicas y antígenos diana. La inmunofluorescencia directa e indirecta y técnicas serológicas como el ELISA se realizan ya de rutina en centros de referencia. Sin embargo, estas técnicas no siempre llegan al diagnóstico de certeza. El desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas más sensibles, específicas y reproducibles contribuirá a que los diagnósticos sean más exactos y por tanto el manejo terapéutico y pronóstico de los enfermos sea mejor. La microscopía confocal es una técnica prometedora en este campo.

Objetivos

- Determinar si la microscopía confocal es útil en el diagnóstico de las enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes.
- Estudiar mediante microscopía confocal una serie de pacientes con penfigoide ampolloso
- Estudiar mediante microscopía confocal una serie de pacientes con dermatosis ampollosa IgA lineal

Material y métodos

Se trata de un estudio prospectivo en un contexto clínico asistencial realizado en un hospital de tercer nivel. Los sujetos del estudio fueron pacientes referidos al Servicio de Dermatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón con sospecha clínica de enfermedad autoinmune subepidérmica (presencia de ampollas tensas y / o lesiones mucosas sugestivas).

En todos los pacientes se tomaron muestras para histopatología convencional, inmunofluorescencia directa convencional e inmunofluorescencia directa de piel separada. En el mismo acto quirúrgico se tomó una biopsia para estudio mediante microscopía confocal. Sobre esta biopsia se realizó la técnica FOAM (*fluorescence overlay antigen mapping*), que combina la detección mediante fluorescencia directa de depósitos de anticuerpos patológicos (Ig G o Ig A) o de factores de complemento (C3), con la detección de varios componentes de la unión dermoepidérmica para su colocalización. Para ello se realizaron cortes de 4 μm de tejido

congelado que se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón frente a las estructuras de la unión dermoepidérmica (β_4 -integrina, laminina o colágeno tipo IV). Después de un lavado, las muestras se incubaron en una mezcla de anticuerpos secundarios marcados con distintos fluorocromos: anticuerpos frente a IgG de ratón marcados con Cy3 para la detección de las estructuras de la unión dermoepidérmica y anticuerpos frente a IgG, IgA o C3 humanos marcados con FITC para la detección directa de posibles depósitos patológicos en las muestras de los pacientes. El tejido se visualizó en el microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Resultados

Durante un período de 3 años, se recogieron biopsias de 44 pacientes con sospecha de enfermedad ampollosa subepidérmica autoinmune (EASA).

En 34 pacientes se confirmó que padecían enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes. Fueron diagnosticados en 25 casos de penfigoide ampolloso, en 7 casos de dermatosis ampollosa IgA lineal, en 1 caso de lupus eritematoso ampolloso y en otro caso de epidermólisis ampollosa adquirida.

Se realizó un estudio inicial para determinar los patrones de microscopía confocal de cada EASA.

Se estudiaron cuatro pacientes con diagnóstico confirmado de penfigoide ampolloso, dermatosis ampollosa IgA lineal, epidermólisis ampollosa adquirida y lupus eritematoso ampolloso. Las muestras de todos los pacientes se tiñeron para colágeno IV, laminina y β 4-integrina.

Como conclusión del estudio piloto, se confirmó la hipótesis de que la técnica FOAM (*fluorescent overlay antigen mapping*) realizada mediante microscopía confocal era sensible para detectar los depósitos autoinmunes en las enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes. Se encontraron hallazgos específicos en cada una de las distintas enfermedades analizadas, por lo que esta técnica se suma a las ya existentes para el diagnóstico diferencial de la EASA.

Como continuación del estudio, se procedió a analizar en condiciones de práctica clínica habitual las muestras de pacientes de penfigoide ampolloso y dermatosis ampollosa IgA lineal.

De los 25 pacientes con penfigoide ampolloso, se pudo realizar microscopía confocal en 22 de ellos. En los 25 pacientes se realizó además inmunofluorescencia directa (IFD) para IgG, IgA y C3 y estudio de inmunofluorescencia de piel separada mediante CINa 1M. Se consideró positiva la IFD si se encontraba una banda de fluorescencia lineal en la membrana basal. En la técnica de piel separada se valoró que la banda de fluorescencia quedase en el

techo o en el suelo de la hendidura formada tras la incubación con C1Na.

La inmunofluorescencia directa fue positiva para C3 en 23 de 25 casos (92%). Fue positiva para IgG en 17 de 25 casos (68%). La técnica de inmunofluorescencia directa en piel separada solo obtuvo resultados diagnósticos en 13 de 25 casos (52%).

La microscopía confocal se pudo realizar en 22 de los 25 pacientes y consiguió el doble objetivo de detectar los depósitos autoinmunes y localizar su nivel en la membrana basal en el 100% de los casos. Por tanto, la sensibilidad más alta fue para la microscopía confocal comparada con las técnicas de fluorescencia directa sobre piel sin tratar o tratada para separar sus capas.

De los 7 casos de dermatosis ampollosa IgA lineal (DAIL) se pudo realizar microscopia confocal en 5 de ellos. En 2 de los casos analizados (uno de ellos, el caso piloto), se situaron los depósitos en la parte alta de la lámina lúcida. En tres de los casos, los depósitos colocalizaron con el colágeno IV de la lámina densa. Esto confirmó **que** la DAIL es una enfermedad inmunológicamente heterogénea en la que se han descrito antígenos relacionados con proteínas localizadas en niveles más superficiales y más profundos.

Conclusiones

1. La microscopía confocal es una técnica útil en el diagnóstico de las enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes.

2. La técnica FOAM es más sensible que la combinación de la inmunofluorescencia directa convencional e inmunofluorescencia directa en piel separada para el diagnóstico de penfigoide ampolloso.

3. Los hallazgos en la serie de penfigoide ampolloso fueron homogéneos y reproducibles.

4. Los hallazgos en la serie de dermatosis ampollosa IgA lineal confirman la heterogeneidad antigénica de esta enfermedad.

RESUMEN EN INGLÉS

Introduction

Subepidermal autoimmune bullous diseases are a complex group of entities featuring rupture of the dermal-epidermal junction. Its high morbidity is caused by blisters, erosions and scars all over the skin surface. Involvement of mucous membranes (oral, conjunctival, laryngeal, esophageic and genital) is possible. Besides, an association with neurologic and oncologic disease has been stated.

There is a great clinical and histological overlap between different diseases, because several antigens can be involved. In the last two decades, new antigens have been discovered, with clinical-immunological correlation. Direct immunofluorescence, indirect immunofluorescence and serological techniques such as ELISA are already performed in referral centers. However, these techniques do not always lead to a certain diagnosis. Development of new immunological tests, sensitive, specific and reproducible will improve diagnostic accuracy, patient management and prognosis. Confocal microscopy is a promising technique in this field.

Objectives

- To determine if confocal microscopy is useful in the diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disease.
- To study a series of patients of bullous pemphigoid with confocal microscopy.

-Studying a series of patients of linear IgA bullous dermatosis with confocal microscopy.

Methods

This is a prospective study, performed in a clinical setting, in a tertiary level hospital. Subjects of the study were referred to the Dermatology Clinic with a clinical suspicion of subepidermal autoimmune bullous disease (due to the presence of tense blisters or typical mucosal lesions).

All patients were studied by conventional histopathology, conventional direct immunofluorescence (DIF) and salt-split direct immunofluorescence. At the same time, another biopsy was taken for confocal microscopy. This biopsy was used to perform the FOAM technique (fluorescent overlay antigen mapping). 4- μ m frozen tissue sections were incubated with monoclonal antibodies against β_4 -integrin, laminin or type IV collagen. After rinsing, specimens were incubated in a new mixture: Cy3-labelled goat anti-rabbit IgG and FITC-labelled goat anti-human IgA, IgG or C3. Tissue was then visualized in confocal laser spectral microscope Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems) at Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Results

For a period of 3 years, 44 biopsies were taken from patients with clinical suspicion of subepidermal autoimmune bullous disease. In 34 patients, this diagnosis was confirmed. Final diagnoses were

bullous pemphigoid (BP) in 25 cases, linear IgA bullous dermatosis (LIBD) in 7 cases, bullous lupus erythematosus (BLE) in one case and epidermolysis bullosa acquisita (EBA) in the last case.

A pilot study was started to determine the different patterns of deposition of each of the four diseases. Four patients, with a confirmed diagnosis of BP, LIBD, BLE and EBA were studied. All their specimens were dyed for type IV collagen, laminin and β 4-integrin.

This pilot study confirmed the initial hypothesis that FOAM technique with confocal microscopy was sensitive and specific for the diagnosis of subepidermal bullous disease. Specific findings were seen in each of the analyzed diseases, so this technique can be used in combination with previous for the diagnosis of subepidermal bullous disease.

In the next stage of the study, a series of patients of bullous pemphigoid was studied, under clinical conditions. Confocal microscopy could be performed in 22/25 bullous pemphigoid patients. In 25 patients, conventional DIF and salt-split DIF were performed. DIF was considered positive if a linear band of fluorescence was found in the dermal-epidermal junction. Salt-split DIF was considered positive when there was a NaCl-induced split and immune deposition occurred in the roof or in the floor of the split.

DIF was positive for C3 in 23/25 cases (92%). It was positive for IgG in 17/25 cases (68%). Salt-split DIF was only positive in 13/25 cases (52%). Confocal microscopy could be performed in 22/25 cases and reached its double goal of detecting and localizing autoimmune deposition in 22/22 cases (100%). Thus, sensitivity was higher for confocal microscopy.

In the 7 cases diagnosed as LIBD, confocal microscopy could be performed in 5. In 2 of them, deposits were localized in the upper aspect of lamina lucida. In 3 of the cases, IgA colocalized with type IV collagen in lamina densa. These results confirm that LIBD is a heterogeneous disease, in which different antigens, upper and deeper, can take part.

Conclusions

1. Confocal microscopy is a useful technique in the diagnosis of subepidermal autoimmune bullous diseases.
2. Fluorescent Overlay Antigen Mapping is more sensitive than the combination of conventional DIF and salt-split DIF for the diagnosis of bullous pemphigoid.
3. In the bullous disease series, confocal microscopy findings were homogeneous and reproducible.
4. In the LIBD series, microscopic findings confirmed the heterogeneous immunological nature of this disease.

Introducción

1.INTRODUCCIÓN

1.1.LA UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA

La unión dermoepidérmica es una estructura de alta complejidad molecular formada por los queratinocitos basales, la membrana basal epidérmica y la parte superior de las papilas dérmicas **(Figura 1)**.

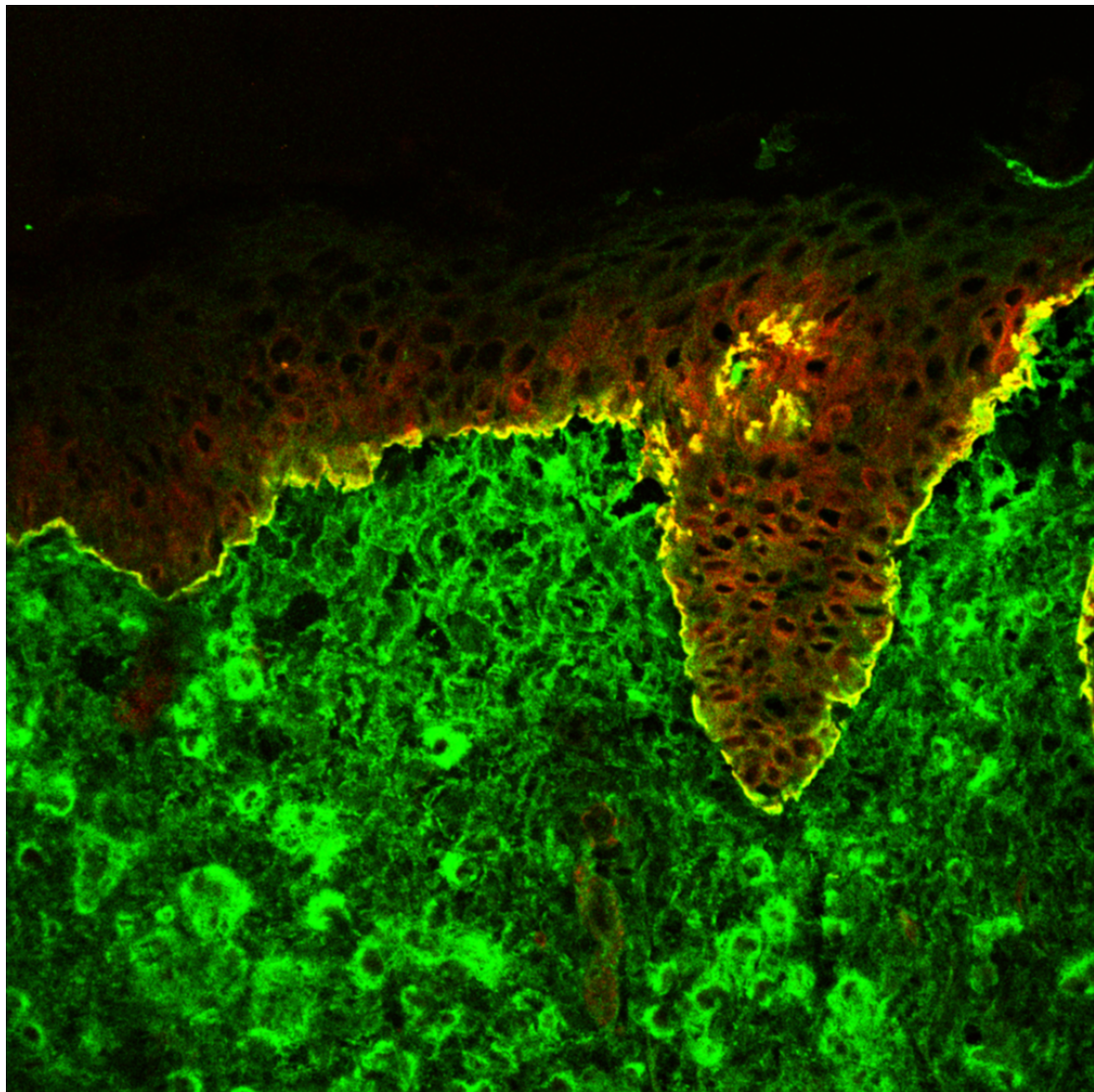


Figura 1

Imagen de microscopía confocal de la unión dermoepidérmica

La unión dermoepidérmica es una estructura altamente especializada que actúa como vehículo de comunicación entre epidermis y dermis¹. Hoy no se mantiene la visión estática, puramente física de la unión dermoepidérmica, sino que se considera que realiza las siguientes funciones:

- Adhesiva: sustrato para la adhesión de los queratinocitos basales, anclaje dermoepidérmico, transmisión mecánica entre epidermis y fibras elásticas y colágenas dérmicas.
- Barrera: regulación de la permeabilidad de macromoléculas en ambos sentidos.
- Señalización celular: transmisión de señales de diferenciación, morfogénesis y apoptosis epidérmica, permeabilidad de células inflamatorias, molde para la reparación tisular.

Como se ha dicho anteriormente, la unión dermoepidérmica consta de la membrana basal y de estructuras diferenciadas de los queratinocitos basales y la dermis papilar² (**Figura 2**).

Los queratinocitos basales presentan un citoesqueleto con filamentos intermedios de queratina 5 y 14 que se conectan con unas estructuras basales llamadas hemidesmosomas y una membrana plasmática basal especializada.

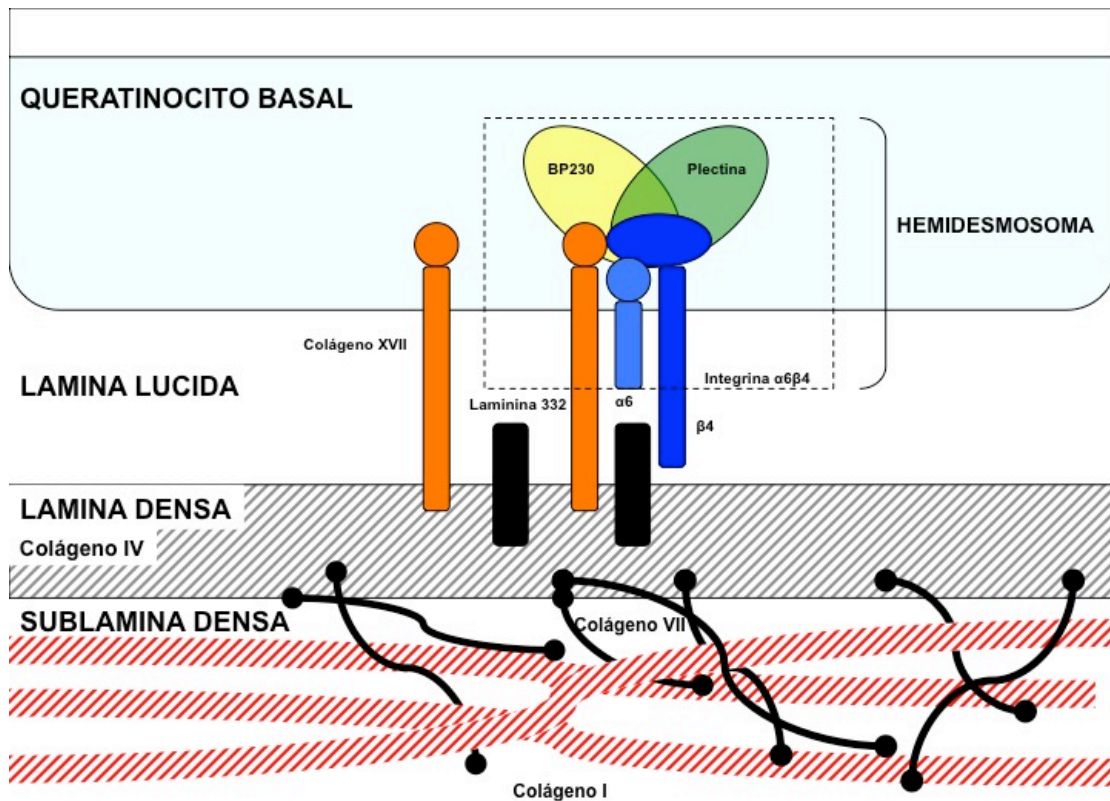


Figura 2

Estructuras y proteínas principales de la unión dermoepidérmica

La membrana basal epidérmica se puede subdividir a su vez en varias zonas, caracterizadas inicialmente por microscopía electrónica por su densidad a los electrones. En dirección epidermis-dermis hay una zona clara llamada lámina lúcida y una oscura llamada lámina densa. Hoy se sabe que la lámina lúcida es un espacio artefactual creado por deshidratación durante el procesamiento convencional de tejidos³, pero en el presente trabajo preferimos mantener este término por su estabilidad en la literatura.

La interfase entre lámina densa y dermis papilar se denomina sublámina densa y contiene estructuras denominadas fibrillas de anclaje y placas de anclaje junto a proteínas fibrilares dérmicas.

Las moléculas conocidas de interés para el estudio de la patología autoinmune se localizan en los queratinocitos basales, la membrana basal y las fibrillas de anclaje. Describimos a continuación tan sólo las principales moléculas implicadas en patología autoinmune o en sus técnicas diagnósticas.

1.1.1. Queratinocito basal y lámina lúcida

Se tratan conjuntamente por ocupar los hemidesmosomas ambas regiones. Los hemidesmosomas son estructuras con función de anclaje y señalización celular que están situados en la membrana plasmática basal del queratinocito basal. Las proteínas fundamentales del hemidesmosoma son colágeno XVII, plectina, BP230 e integrina $\alpha 6\beta 4$.

Colágeno XVII

Molécula también conocida como BPAG2 (*bullous pemphigoid antigen 2*) o BP180 (*bullous pemphigoid 180 kDa*). Es la proteína implicada con más frecuencia en la patología autoinmune de la unión dermoepidérmica y la mejor conocida^{4,5}.

Es una glicoproteína transmembrana (**Figura 3**). Se ha clasificado dentro de la familia de los colágenos como colágeno XVII (COL17A1) porque en su extremo C-terminal existen 15 secuencias repetidas tipo colágeno (Gly-X-Y). Su extremo N-terminal es intracelular y se une a BP230, plectina y a la subunidad $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$ ^{6,7}. El extremo C-terminal se extiende a través de la lámina lúcida y llega a la lámina densa.

El colágeno tipo XVII existe *in vivo* en dos formas, la completa, de 180 kDa, y el dominio extracelular de 120 kDa que se separa por proteólisis *in vivo*. Este ectodominio se llama LAD-1. Los dominios extracelulares se ensamblan de 3 en 3 formando triples hélices tipo colágeno⁸.

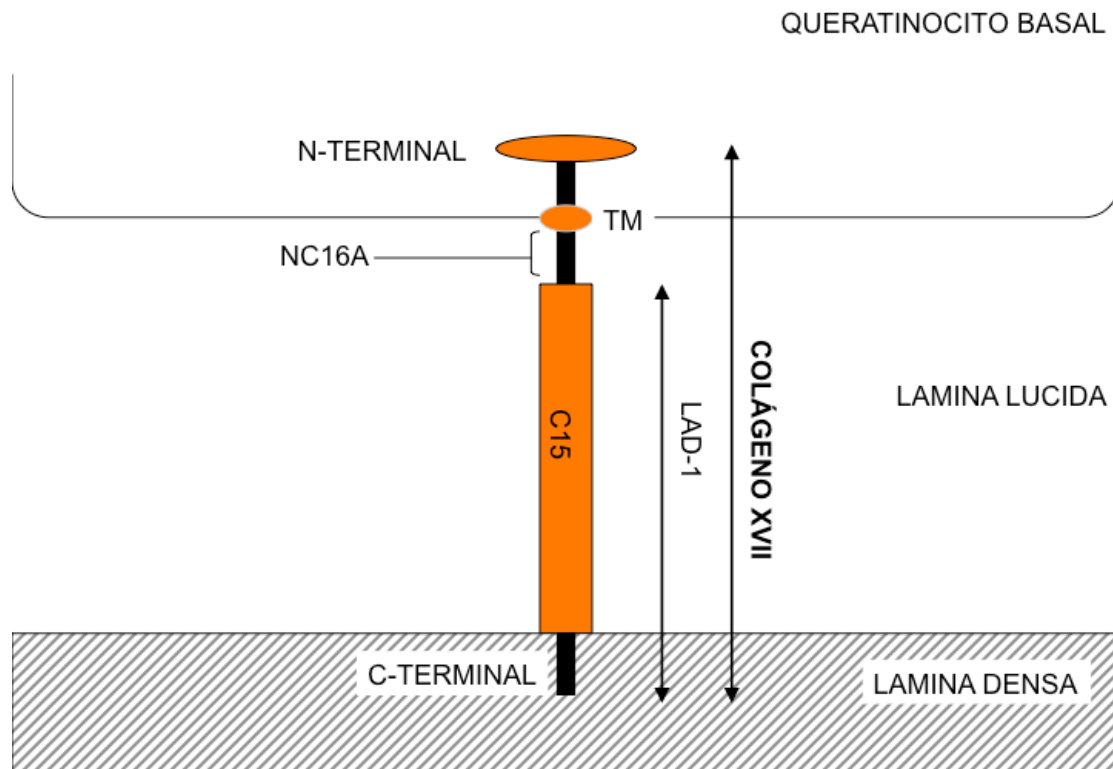


Figura 3:
Estructura del colágeno XVII o BP180

Es particularmente importante en la patología cutánea el segmento extracelular del colágeno XVII más próximo a la membrana plasmática, llamado NC16A (*non-collagenous 16*), que es el decimosexto segmento no colágeno. Se une a la subunidad $\alpha 6$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$ ⁹.

Se han demostrado anticuerpos séricos contra el colágeno XVII en el penfigoide ampolloso, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas, dermatosis IgA lineal y liquen plano penfigoide. En penfigoide ampolloso, penfigoide gestacional y dermatosis IgA lineal puede detectarse inmunidad contra NC16A. En algunos penfigoides de mucosas hay reacción contra epítomos más C-terminales. El fragmento LAD-1 está implicado en dermatosis IgA lineal y penfigoide ampolloso.

Se ha demostrado patogenicidad de anticuerpos contra colágeno XVII en un modelo de ratón¹⁰. En la epidermólisis ampollosa juntural no Herlitz se encuentra mutado el gen del colágeno XVII por lo que la proteína resultante no es funcional. Se ha generado otro modelo animal eliminando el dominio NC14A (equivalente al NC16A) del colágeno XVII de ratones^{11,12}. Estos ratones desarrollaron eroniones, vesículas subepidérmicas, infiltrados eosinofílicos y autoanticuerpos contra la membrana basal como en el penfigoide ampolloso humano.

BP230

Es una proteína de 230 kDa también denominada BPAG1 (*bullous pemphigoid antigen 1*)^{1,2}. Se trata de una proteína intracelular del queratinocito basal situada en el complejo hemidesmosómico. Pertenece a la familia de las plaquinas. Su función es unir los filamentos intermedios del citoesqueleto al hemidesmosoma. Su extremo C-terminal se asocia a los filamentos intermedios de

queratina. Su extremo N-terminal se une al colágeno XVII y subunidad $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$, entre otras.

En penfigoide ampuloso y dermatosis IgA lineal aparecen autoanticuerpos contra BP230 pero se duda que sean patogénicos. Más bien se cree que su producción se induce secundariamente a la reacción inflamatoria en la unión dermoepidérmica.

Se ha descrito recientemente un subtipo de epidermólisis bullosa hereditaria con ausencia de la proteína BP230¹³.

Plectina

La plectina es una proteína globular situada en el lado citoplasmático del hemidesmosoma, también de la familia de las plaquinas. Se une por su extremo C-terminal a los filamentos intermedios de queratina y por su extremo N-terminal a la subunidad $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$, BP230 y actina¹⁴.

Se han descrito algunos casos de reactividad contra plectina en patología autoinmune, sobre todo penfigoides ampulosos, pero tiene una importancia secundaria¹⁵⁻¹⁷.

La plectina está mutada en un tipo de epidermólisis ampulosa simple (epidermólisis ampulosa simple con distrofia muscular)¹⁸.

Integrina $\alpha 6\beta 4$

Las integrinas son glicoproteínas transmembrana que median la adhesión célula-matriz o célula-célula con capacidad de transducir señales reguladoras de expresión génica y ciclo celular. Son heterodímeros, lo que significa que consisten de 2 subunidades

distintas entre sí^{1,2}. Los queratinocitos basales expresan $\alpha 2\beta 1$ (membranas laterales y apical), $\alpha 3\beta 1$ (en membranas laterales y en membrana plasmática basal pero no asociada al hemidesmosoma, se une a laminina 5) y $\alpha 6\beta 4$ (proteína hemidesmosómica).

La subunidad $\beta 4$ tiene un extremo C-terminal intracelular y un extremo N-terminal extracelular. El dominio C-terminal se une a plectina y colágeno XVII. El dominio extracelular se une a la laminina 5. Por tanto media la conexión del hemidesmosoma por un lado con los filamentos intermedios de queratina y por otro lado con lámina densa.

La subunidad $\alpha 6$ se une al dominio NC16A del colágeno XVII.

Las dos subunidades son antígenos en el penfigoide de mucosas oral y ocular. También existe un modelo animal. La mutación de cualquiera de las 2 subunidades conduce a la epidermólisis ampollosa juntural con atresia pilórica.

1.1.2.Lámina densa

La lámina densa se compone principalmente de colágeno IV, lamininas y proteoglicanos.

Colágeno IV

El colágeno IV es un heterotrímero formado a partir de seis genes diferentes, de los cuales en la piel se expresan COL4A1 (subunidad $\alpha 1(IV)$), COL4A2 (subunidad $\alpha 2(IV)$), COL4A3 (subunidad $\alpha 3(IV)$), COL4A5 (subunidad $\alpha 5(IV)$). En común con otros colágenos tiene un largo dominio triple hélice tipo colágeno. Tiene 2 dominios no

colágenos globulares en los extremos C-terminal (NC1) y N-terminal (NC2) que permiten el ensamblaje con la propiedad de crear de redes colágenas planas.

El dominio NC1 de $\alpha 3(\text{IV})$ es la diana en el síndrome renopulmonar de Goodpasture. En un paciente con insuficiencia renal y enfermedad ampollosa subepidérmica se detectó IgG contra el dominio NC1 de $\alpha 5(\text{IV})$.

El colágeno IV es un importante marcador de la lámina densa en los métodos diagnósticos.

Laminina 332

Las lamininas son una familia de glicoproteínas heterotriméricas que cumplen funciones estructurales y de señalización. Cada laminina está formada por tres subunidades (α, β, γ). La laminina 332 ($\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$) se encuentra en la interfase entre lámina lúcida y lámina densa e interacciona con las integrinas del hemidesmosoma y la membrana plasmática basal del queratinocito.

La laminina 332 se conoce también como epiligrina o laminina 5 y un tipo de penfigoide de mucosas con autoinmunidad contra laminina 332 se denominaba penfigoide antiepiligrina¹⁹⁻²¹. La mayoría de los pacientes con penfigoide de mucosas y autoinmunidad contra laminina 332 reconocen la subunidad $\alpha 3$ ²².

1.1.3.Sublámina densa

Las fibrillas de anclaje son unas estructuras arciformes observables mediante microscopía electrónica, que se componen fundamentalmente de colágeno VII²³.

Colágeno VII

Es otra proteína de la familia del colágeno. Es un homotrímero, formado por tres cadenas idénticas de 290 kDa. Tiene un dominio globular no colágeno N-terminal (NC1) donde se localizan los epítopos inmunodominantes. En el extremo C-terminal se sitúa el dominio NC2²⁴⁻²⁶.

Es el antígeno implicado en la epidermólisis ampollosa adquirida, el lupus eritematoso sistémico ampollosa y algunos casos de dermatosis IgA lineal²⁷⁻²⁹.

Su alteración de causa genética se traduce en distintos tipos de epidermólisis ampollosa distrófica.

1.2.LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS AUTOINMUNES

Las enfermedades ampollas autoinmunes se deben al ataque mediado por autoanticuerpos específicos contra determinadas proteínas cutáneas, de manera que al destruirse las uniones intercelulares o las uniones de los queratinocitos con la matriz extracelular se produce una pérdida de cohesión epidérmica o dermoepidérmica que se expresa clínicamente mediante ampollas y erosiones³⁰.

Se distinguen dos grandes grupos dentro de las enfermedades ampollas autoinmunes: las intraepidérmicas, representadas principalmente por el pénfigo vulgar y las subepidérmicas, cuyo miembro más importante es el penfigoide ampolloso. El grupo de las enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes es el de diagnóstico más complejo, ya que múltiples proteínas de la membrana basal pueden estar implicadas y existe un gran solapamiento clínico e histológico entre múltiples enfermedades.

Aunque la incidencia global de las enfermedades ampollas autoinmunes es baja, constituyen el grupo de enfermedades cutáneas no neoplásicas con mayor morbimortalidad. La morbilidad se debe a la impotencia funcional de las áreas cutáneas afectadas por erosiones crónicas o cicatrices y a la posible afectación de mucosa oral, conjuntival, laríngea, esofágica y genitourinaria con las consecuencias clínicas de ceguera, dificultad respiratoria, estenosis esofágica y y estenosis urinaria. La mortalidad ocurre

sobre todo en relación con infecciones secundarias y desequilibrios hidroelectrolíticos. En el grupo de enfermedades ampollosas subepidérmicas (las más frecuentes en nuestro medio), la edad media de los pacientes es elevada, lo que aumenta todavía más la morbimortalidad de estas enfermedades.

1.3.LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES

El ataque autoinmune contra la unión dermoepidérmica desencadena un grupo de enfermedades denominadas enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes (EASA)^{1,2}. Las EASA tienen un mecanismo patogénico común por el que autoanticuerpos contra determinadas moléculas de la unión dermoepidérmica inducen una reacción inflamatoria en el área de las estructuras diana y una pérdida de función de moléculas de adhesión con la subsiguiente formación de ampollas subepidérmicas y lesiones secundarias.

En el momento actual existe una investigación muy activa a nivel mundial en el campo de las ampollosas subepidérmicas para intentar buscar todos los antígenos implicados y la posible correlación clínico-inmunológica entre manifestaciones clínicas y antígeno diana. El conocimiento y diagnóstico de las enfermedades ampollosas autoinmunes subepidérmicas ha sido revolucionado por las técnicas inmunológicas^{31,32}:

1. **Inmunofluorescencia directa**³³⁻³⁵: permite localizar depósitos autoinmunes de inmunoglobulinas o complemento en la membrana basal e identificar patrones de depósito característicos. Se realiza de rutina en el HGUGM.

2. **Inmunofluorescencia indirecta**: estudia la fijación de anticuerpos contenidos en el suero de enfermos sobre sustratos de piel humana o esófago de mono.

3. **Inmunofluorescencia directa de piel separada**: estudia los depósitos de autoanticuerpos tras separar la piel en el laboratorio por incubación con NaCl 1M.

4. **Inmunoblot** Variante de Western Blot donde los anticuerpos patológicos reconocen proteínas separadas por electroforesis. No disponible de forma rutinaria en ningún hospital de España

5. **ELISA**. Disponible en el HGUGM para desmogleína 1 y 3 (antígenos implicados en el pénfigo vulgar).

La EASA más frecuente es el penfigoide ampolloso, pero también pertenecen al grupo el penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas, penfigoide anti-p200, liquen plano penfigoide, epidermólisis ampollosa adquirida, dermatosis IgA lineal, lupus eritematoso ampolloso y dermatitis herpetiforme (**Tabla 1**). Dentro de las EASA es característico el solapamiento clínico e histopatológico entre distintas entidades.

ENFERMEDAD	PRINCIPALES ANTÍGENOS IMPLICADOS
PENFIGOIDE AMPOLLOSO	Colágeno XVII BP230
PENFIGOIDE GESTACIONAL	Colágeno XVII BP230
PENFIGOIDE ANTI-P200	Proteína de 200 kDa: laminina- γ 1
LIQUEN PLANO PENFIGOIDE	Colágeno XVII
PENFIGOIDE DE MUCOSAS	Colágeno XVII BP230 Integrina α 6 β 4 Laminina 332
Penfigoide anti-laminina 332	
EPIDERMÓLISIS AMPOLLOSA ADQUIRIDA	Colágeno VII
DERMATITIS HERPETIFORME	Transglutaminasa epidérmica
DERMATOSIS IGA LINEAL	Colágeno XVII LAD-1 BP230 Colágeno VII
LUPUS ERITEMATOSO AMPOLLOSO	Colágeno VII

Tabla 1:

Listado de las principales enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes con las dianas antigénicas asociadas con cada enfermedad

•

Los estudios inmunológicos, que nacieron para la investigación y de hecho han definido nuevos subtipos de EASA, se han ido incorporando progresivamente a la clínica y hoy en día resultan absolutamente imprescindibles para el diagnóstico de este grupo de enfermedades.

A pesar de todo, los estudios inmunológicos no han hecho más que incrementar la sensación de inmenso desconocimiento que se tiene

al profundizar en las EASA. En la práctica ocurre que casos clínicamente sospechosos de un tipo de EASA se corresponden inmunológicamente con otra^{36,37}. Hay superposiciones clínico-inmunológicas y exclusivamente inmunológicas. Un ejemplo de esto último es una serie de casos de la literatura con clínica de penfigoide ampuloso y clara reactividad frente a colágeno XVII y desmogleína 3 sin las lesiones en mucosas características del pénfigo vulgar³⁸⁻⁴⁵.

Las superposiciones se atribuyen en muchos casos a la expansión de epítomos, un proceso por el cual, debido al daño tisular por un proceso antiinflamatorio autoinmune, la exposición de un antígeno previamente "secuestrado" conduce a una respuesta autoinmune secundaria frente a este antígeno⁴⁶⁻⁴⁸.

1.4.MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES

La importancia del diagnóstico preciso de las EASA reside en el diferente pronóstico que tienen las distintas enfermedades y su diferente abordaje terapéutico. Por ejemplo, la EAA tiene una característica resistencia a los corticoides orales que la diferencia del penfigoide ampuloso, enfermedad con inmunofluorescencia directa casi idéntica.

Los métodos diagnósticos en las EASA tienen 3 objetivos:

1) Distinguir las EASA de otros grupos de enfermedades vesiculoampollosas:

- Enfermedades ampollosas hereditarias.
- Enfermedades infecciosas (virales y bacterianas).
- Otras enfermedades de mecanismo inmunológico (p.ej. eritema exudativo multiforme, reacciones medicamentosas).
- Miscelánea: porfiria cutánea tarda, bullosis diabetorum, ampollas de origen físico, eccema dishidrótico.

2) Distinguir las EASA entre sí.

3) En casos concretos monitorizar el curso de la enfermedad, detectar precozmente los brotes y ajustar el tratamiento.

Dividimos los métodos diagnósticos en dos grandes grupos: aquellos que detectan depósitos autoinmunes en tejidos o suero y el resto de métodos.

1.5.MÉTODOS DIAGNÓSTICOS SIN DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

1.5.1.Histopatología convencional

La biopsia convencional fijada en formol es un punto de partida imprescindible en el diagnóstico histopatológico^{1,32}. La elección del lugar de biopsia es muy importante (**figura 4**). Debe estudiarse el borde de la ampolla o vesícula para observar el lugar de

despegamiento bajo el microscopio. Un estudio ha demostrado la mayor rentabilidad de la biopsia de piel alterada perilesional frente a piel sana⁴⁹. La presencia de un infiltrado rico en eosinófilos, neutrófilos o pobre en células inflamatorias es orientativa pero nunca diagnóstica (**figura 5**).



Figura 4

Lugares recomendados para la realización de biopsias para estudio convencional (negro) y para inmunofluorescencia (rojo)

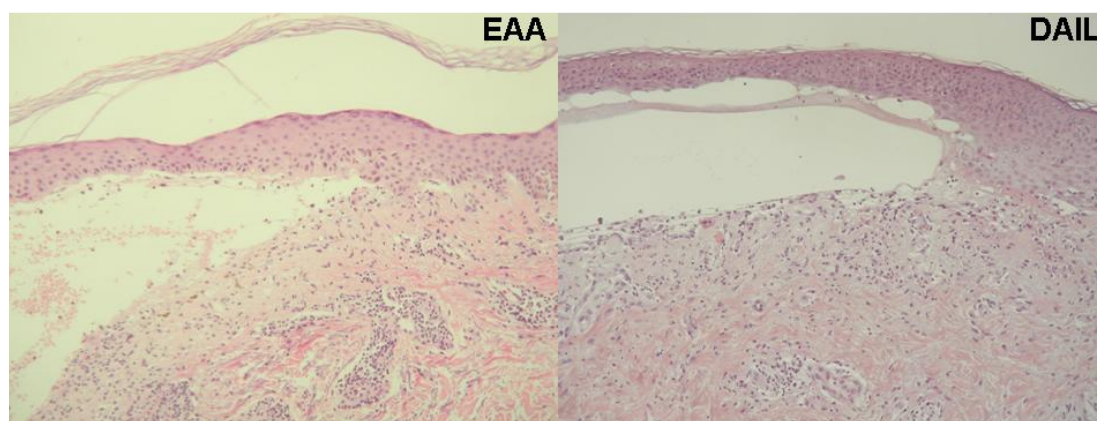


Figura 5

Tinción con hematoxilina-eosina de una epidermolisis ampullosa adquirida (EAA) y una dermatosis IgA lineal (DAIL). En ambas se observa un despegamiento subepidérmico y un infiltrado inflamatorio moderado con neutrófilos. La histopatología convencional no distingue unas enfermedades ampullosas subepidérmicas de otras

1.5.2. Mapeado de antígenos mediante inmunohistoquímica

Para localizar el nivel de separación dentro de la unión dermoepidérmica es posible realizar una tinción de alguna proteína conocida mediante inmunohistoquímica y visualizar la situación de la proteína conocida con respecto al despegamiento patológico¹. La ventaja es que puede realizarse en muestras ya fijadas en formol e incluidas en parafina. Se han marcado las queratinas 5 y 14 del queratinocito basal, las lamininas y el colágeno tipo IV de la lámina densa. El colágeno IV es el más utilizado (**Figura 6**).

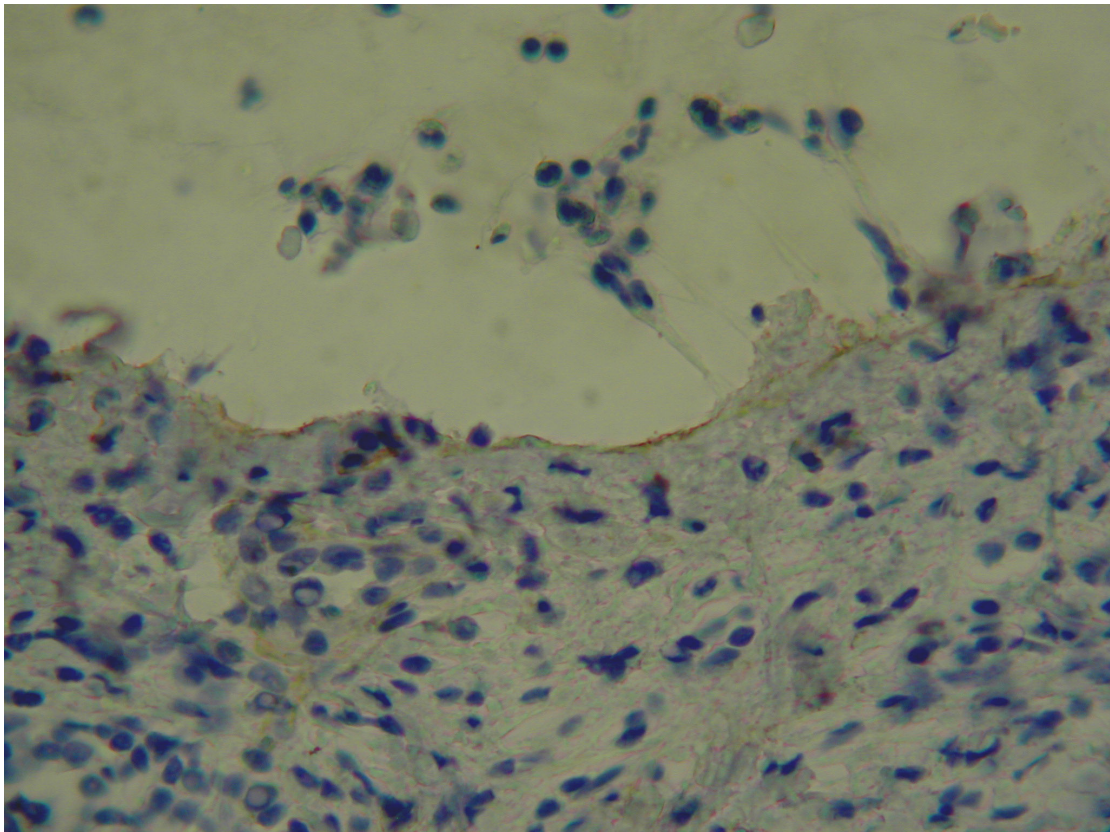


Figura 6

Tinción inmunohistoquímica para colágeno IV, que se observa de coloración parda en el suelo del despegamiento patológico en un caso de penfigoide ampolloso.

1.5.3. Microscopía electrónica convencional

Es una técnica lenta y complicada que no aporta ventajas en el diagnóstico de las EASA al no dar información sobre los depósitos autoinmunes. En trabajos de investigación antiguos se caracterizaron las distintas EASA mediante microscopía electrónica con localización fina del despegamiento y descripción ultraestructural de cambios celulares pero en la actualidad no es un campo muy activo de investigación³².

1.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CON DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

El objetivo de estos métodos es detectar la presencia de autoanticuerpos o complemento depositados en tejidos o circulantes en suero y caracterizarlos en clase y especificidad antigénica.

1.6.1. Detección de depósitos autoinmunes en piel

1.6.1.1. Inmunofluorescencia directa

El objetivo de la inmunofluorescencia directa es detectar depósitos de inmunoglobulinas o complemento en la unión dermoepidérmica^{1,32-35}.

1.6.1.1.1. Inmunofluorescencia directa convencional

- **Toma de la biopsia**

La elección del lugar de la biopsia para inmunofluorescencia directa es clave para la rentabilidad diagnóstica⁵⁰. Nunca deben biopsiarse áreas de ampolla, ya que los depósitos autoinmunes se encuentran

distorsionados por la separación dermoepidérmica y pueden haber sido degradados por la respuesta inflamatoria, dando lugar a falsos negativos. En la familia del penfigoide ampolloso y en la epidermólisis ampollosa adquirida son rentables las áreas adyacentes a las ampollas. Tradicionalmente se ha recomendado la realización de una cuña cutánea radial que incluyera zona de despegamiento y zona periférica, la división de la cuña con el bisturí y el envío de la zona periférica para estudio de inmunofluorescencia directa. El *punch* o sacabocados ha sido desaconsejado por algunos autores por la posibilidad de separar la epidermis con el movimiento rotacional. En nuestro medio, su amplísima difusión y la familiaridad de los patólogos con este formato estandar de biopsia hace que a pesar de todo resulte muy práctica la toma cuidadosa de una muestra independiente para inmunofluorescencia con sacabocados, que es diagnóstica con un tamaño tan pequeño como 3 mm de diámetro (**Figura 4**). En nuestra experiencia nunca se han producido falsos negativos por la toma de biopsias de inmunofluorescencia con sacabocados.

El área corporal puede influir en la rentabilidad de la biopsia. En un estudio se vio que la biopsia de las piernas es menos rentable en el penfigoide ampolloso⁵¹.

En el penfigoide de mucosas hay que elegir las áreas menos traumáticas para biopsiar. Si hay lesiones en piel, deben ser estas las que se biopsien. Si hay lesiones orales y oculares, deben

elegirse las orales. Si solo hay lesiones oculares, hay que valorar el beneficio-riesgo de la realización de la biopsia, dado que esta puede inducir inflamación y cambios cicatriciales.

- **Transporte y conservación de la muestra**

En los centros que disponen de un laboratorio de Anatomía Patológica con unidad de inmunofluorescencia puede transportarse la biopsia en fresco en una gasa empapada en suero isotónico para realizar congelación inmediata. En caso de que la biopsia se haga fuera del horario de recogida de muestras del laboratorio y vaya a ser procesada al día siguiente lo óptimo es conservarla en suero isotónico a temperatura ambiente. Se ha demostrado que esto no solo no altera la muestra sino que además limpia la fluorescencia residual por extravasación en dermis y depósito inespecífico^{52,53}.

En el medio anglosajón es muy utilizado el medio de Michel. Se ha comprobado que las biopsias conservadas en este medio resisten hasta un año a temperatura ambiente. En España no es fácil conseguirlo de forma comercial aunque se puede formular⁵⁴⁻⁵⁷.

Hay comunicaciones aisladas de buena conservación de biopsias en medios como la miel⁵⁸.

- **Procesamiento y tinción**

Hay varios métodos de procesamiento de la biopsia. En el más utilizado la muestra se congela utilizando nitrógeno líquido y un medio comercial de congelación tisular. Se utiliza un protocolo mediante el cual el tejido se congela lentamente y así se evitan

daños y artefactos. La muestra puede guardarse durante períodos prolongados a -80°C o proceder al corte y tinción.

El criostato es un aparato diseñado para cortar muestras en congelación. Suelen generarse criosecciones de 4 a 6 micras aunque se ha demostrado que realizar secciones aún más finas, menores de 4 micras, aumenta la resolución de las imágenes.

La tinción es la mayor diferencia con la histopatología convencional. Para la tinción se utilizan fluorocromos, moléculas que tienen la propiedad de responder a la radiación ultravioleta de determinada longitud de onda emitiendo radiación ultravioleta de otra longitud de onda, generalmente en el espectro visible. El fluorocromo más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína (FITC) que emite fluorescencia verde³⁵.

La clave de la inmunofluorescencia es la utilización de anticuerpos de especies no humanas conjugados con un fluorocromo y específicos contra inmunoglobulinas o complemento humanos. Describimos a continuación las técnicas de marcaje directo e indirecto.

En la técnica directa, la más utilizada de forma rutinaria, se detectan anticuerpos o factores del complemento previamente depositados en la piel o mucosa patológicas, para ello la muestra de tejido se incuba directamente con un anticuerpo antiinmunoglobulina humana (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) o

anticomplemento humano (anti-C3) generado en una especie animal y conjugado habitualmente con FITC.

El marcaje indirecto se hace en dos etapas y utiliza 2 anticuerpos: anticuerpo primario sin marcar para detectar los depósitos patológicos y anticuerpo secundario marcado, para detectar el anticuerpo primario. En el estudio de enfermedades ampollas el anticuerpo primario es una antiinmunoglobulina humana o anticomplemento sin marcar, generado en una especie no humana (ratón, cabra, conejo y otros). El anticuerpo secundario va marcado con fluorescencia y es una anti-IgG murina, anti-IgG caprina o lo que corresponda según el animal de origen, que se une donde se haya unido previamente el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario es el que está conjugado con el fluorocromo y su localización puede verse mediante iluminación con la longitud de onda específica λ que estimula este fluorocromo (**Figura 7**). La técnica de marcaje indirecto aumenta la sensibilidad pero reduce la especificidad al incrementar la tinción inespecífica.

- **Diagnóstico**

El microscopio de fluorescencia convencional tiene un manejo muy semejante al de los microscopios ópticos normales. Es importante ser rápido, ya que la fluorescencia va desapareciendo con el tiempo y la muestra "se quema". Cuando no se esté observando por el ocular debe interrumpirse la llegada de luz al cristal para alargar su vida.

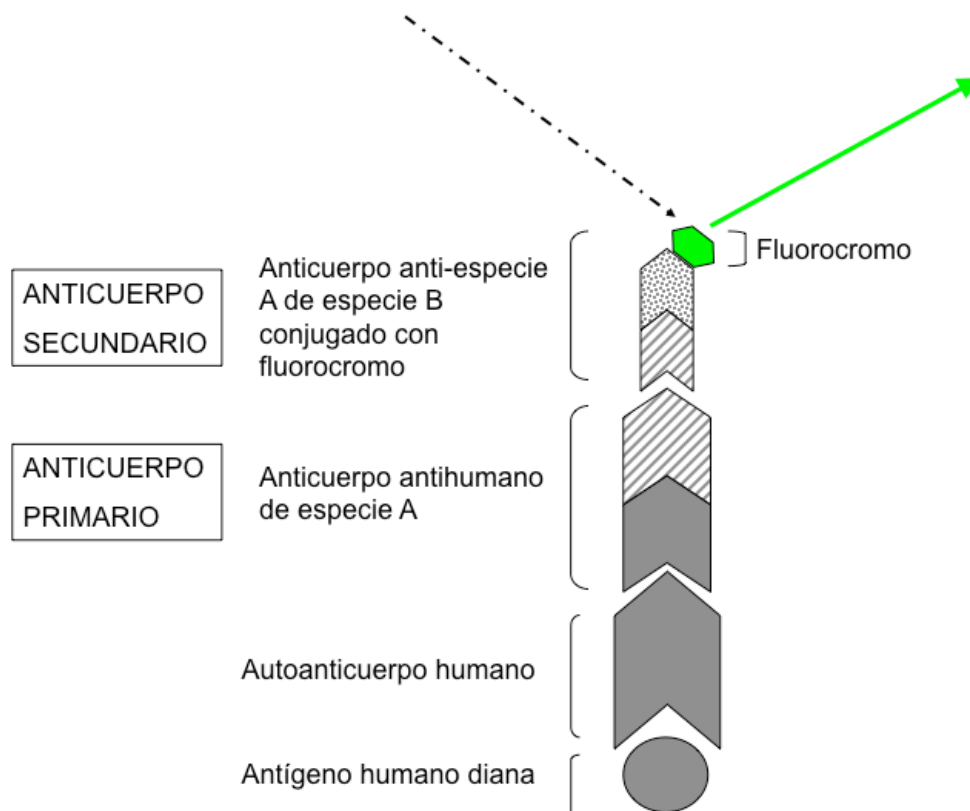


Figura 7

Fundamento de la inmunofluorescencia. Técnica de marcaje indirecto para inmunofluorescencia directa.

En las enfermedades ampollasas subepidérmicas siempre hay depósitos localizados en la unión dermoepidérmica y en la dermatitis herpetiforme además existen depósitos en las papilas dérmicas. Tras comprobar la positividad de la fluorescencia en la unión dermoepidérmica hay que analizar 4 puntos³²⁻³⁵:

- 1) Tipo de depósito autoinmune: IgG, IgA, IgM, complemento.
- 2) Existencia de uno o varios tipos de depósitos
- 3) Patrón de fluorescencia: fundamentalmente lineal o granular.
- 4) Posible existencia de fluorescencia fuera de la unión dermoepidérmica.

Los principales patrones de depósito son el lineal y el granular. Existe un depósito lineal en el penfigoide ampoloso, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas, penfigoide anti-p200, dermatosis IgA lineal, epidermólisis ampolosa adquirida y lupus eritematoso ampoloso, o lo que es lo mismo, en todas las enfermedades ampolosas autoinmunes subepidérmicas excepto en la dermatitis herpetiforme, en que existen depósitos granulares.

Los epitelios foliculares y de glándulas sudoríparas pueden mostrar positividad. Hay que tener cuidado con los artefactos por papilas dérmicas que pueden confundir con vasos.

A) Depósitos únicos en la membrana basal

a1) IgG y/o C3

Se ven en el penfigoide ampoloso, penfigoide de mucosas, penfigoide gestacional, liquen plano penfigoide, penfigoide anti-p200, epidermólisis ampolosa adquirida y lupus eritematoso ampoloso. **(Figura 8).**

Si aparece un depósito de C3 único o más intenso que IgG es sugerente de la familia del penfigoide . Si aparece IgG más intenso que C3 son más probables EAA y LEA.

Vodegel *et al.*⁵⁹ trataron de buscar mayor capacidad diagnóstica a la IFD y subdividieron el patrón lineal en patrón lineal puro y patrón en sierra. El patrón en sierra se divide asimismo en dos: en N y en U. Observaron que el patrón en U es exclusivo de las enfermedades del colágeno VII: EAA y LEA, mientras que el patrón en N ocurre en

todas las demás (penfigoide ampolloso, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas, penfigoide anti-p200, dermatosis IgA lineal). Para observar estos patrones en U y en N hay que realizar criosecciones muy finas, menores de 4 micras, que no suelen hacerse en la práctica rutinaria.

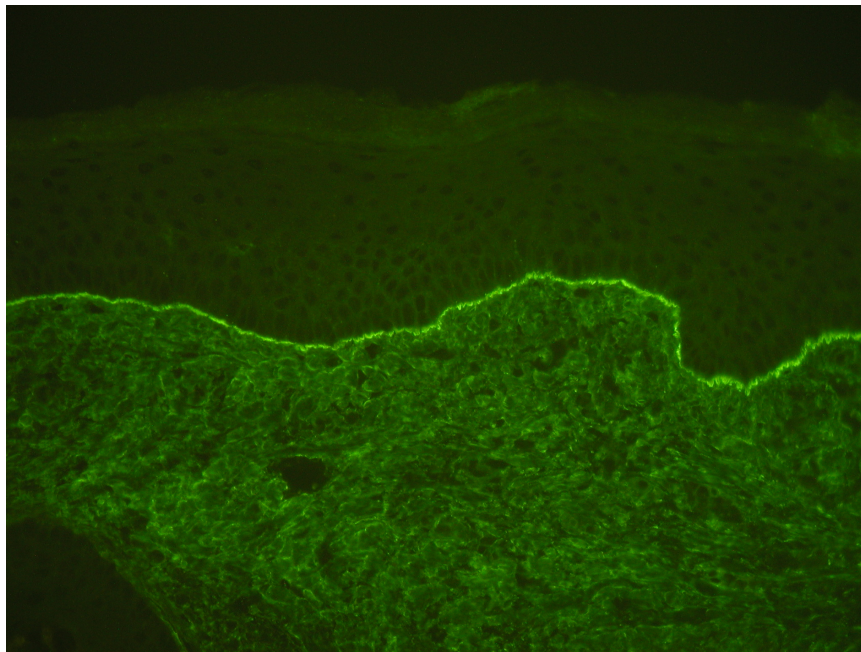


Figura 8
Depósito lineal de IgG en penfigoide ampolloso.

a2)IgA

El depósito lineal de IgA caracteriza la dermatosis IgA lineal (**Figura 9**). El depósito de C3 es más infrecuente y menos intenso. La morfología de los depósitos es similar a los de penfigoide ampolloso y EAA. Como diagnóstico diferencial, algún penfigoide de mucosas puede depositar exclusivamente IgA y C3.

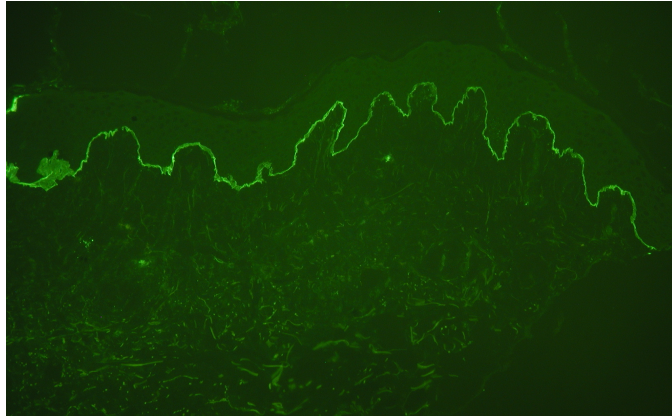


Figura 9
Depósito lineal de IgA en dermatosis IgA lineal

a3) C3

Como ya se ha mencionado, un depósito único de C3 puede verse en penfigoide ampoloso, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas y liquen plano penfigoide (**Figura 10**).

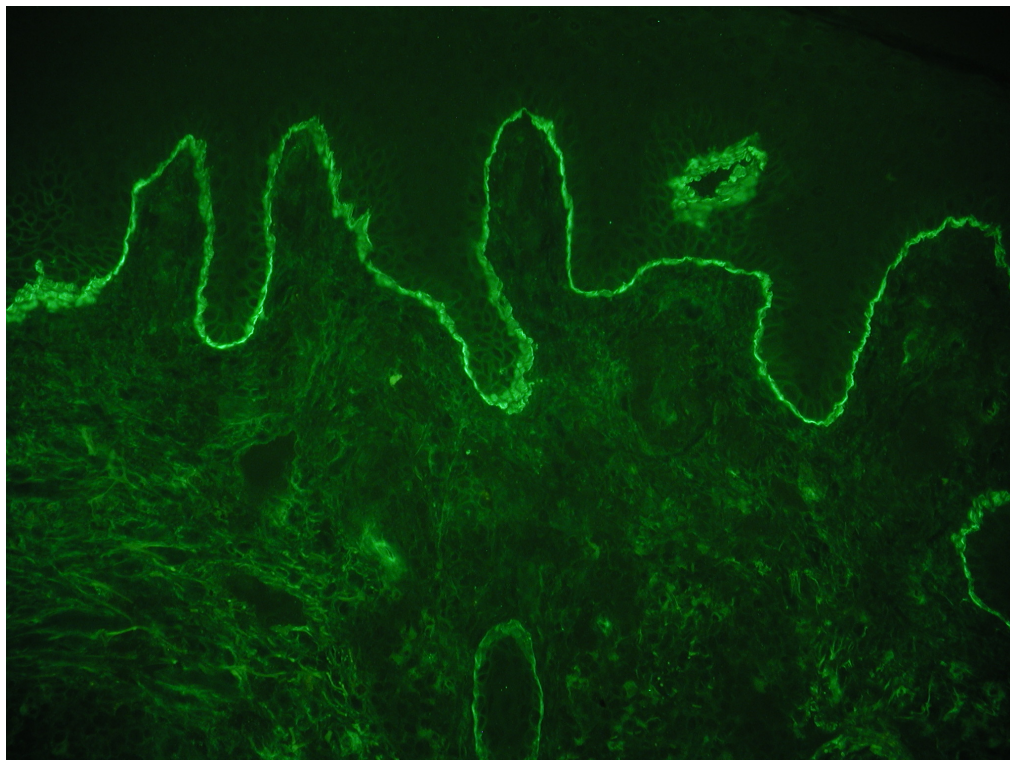


Figura 10
Intenso depósito de C3 en penfigoide ampoloso

B) Depósitos múltiples en la membrana basal

Cuando se deposita más de una clase de inmunoglobulina son más probables EAA y LEA. En la EAA casi siempre hay IgG intensa, en la mitad de los casos hay IgM y en un tercio IgA.

En el LEA, el 60% tienen depósitos indistinguibles de la EAA. El resto tienen depósitos granulares continuos semejantes a los de algunos lupus no ampollosos. El depósito de IgA se asocia a LEA más que a lupus eritematoso no ampolloso.

Es posible la existencia de penfigoide de mucosas con IgG e IgA y dermatosis IgA lineal con IgA e IgG.

C) Depósito en papilas dérmicas

Como ya se ha mencionado, en la dermatitis herpetiforme se producen depósitos granulares de IgA y C3 en las papilas dérmicas y unión dermoepidérmica. La imagen es patognomónica. Se deposita IgA en el 100% y C3 en el 50%. Son posibles los depósitos IgG e IgM, pero con menos frecuencia e intensidad (**Figura 11**).

- **Almacenamiento**

Se ha investigado la estabilidad de las preparaciones de inmunofluorescencia almacenadas a temperatura ambiente. En un estudio se comprobó que a los 12 meses eran visibles el 92% de las preparaciones pero a los 20 meses tan solo el 28%. Por tanto, es muy recomendable fotografiar los resultados y almacenarlos digitalmente⁶⁰.

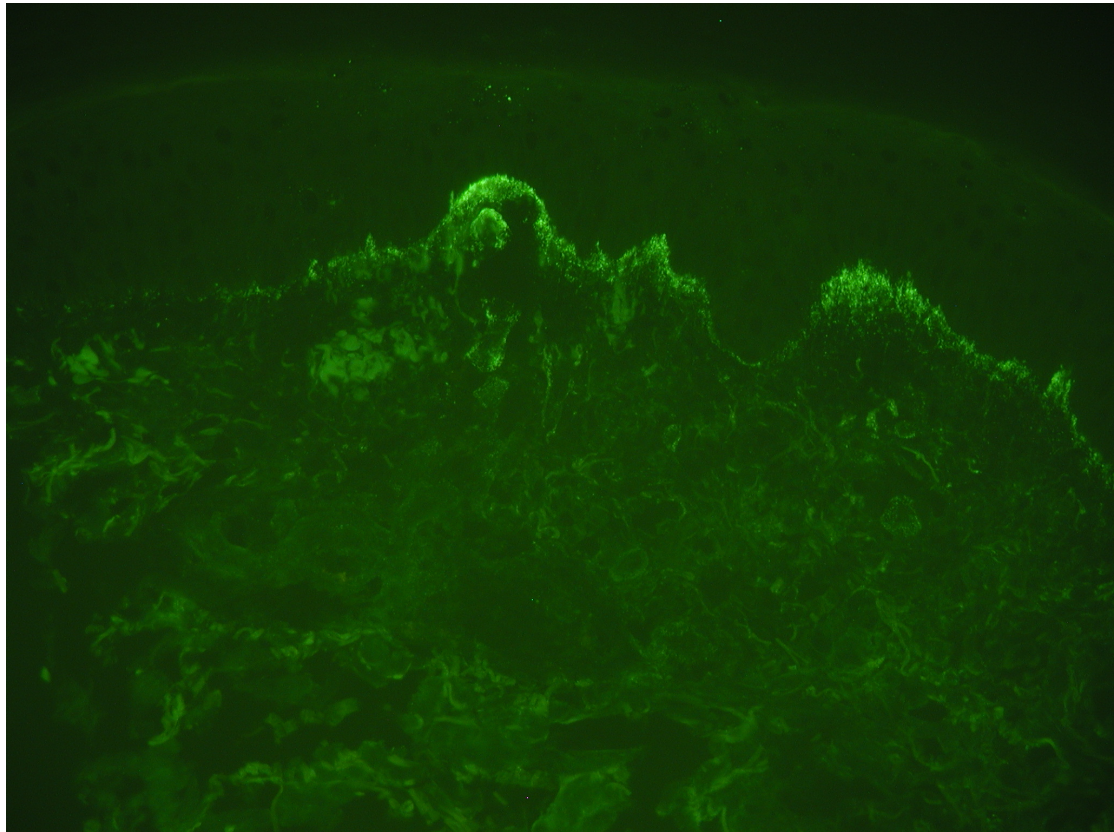


Figura 11

Depósito granular de IgA en dermatitis herpetiforme

1.6.1.1.2. Inmunofluorescencia directa sobre piel separada en NaCl 1M

La separación de la piel a lo largo de la unión dermoepidérmica a un nivel conocido es un ingenioso abordaje para diferenciar enfermedades. Se han publicado 4 métodos de separación: NaCl 1M, tripsina, creación de una ampolla por succión y activación de proteasas en salino tamponado con fosfatos. En todos estos métodos el colágeno XVII se mantiene en el lado epidérmico, mientras que la laminina y los colágenos IV y VII se mantienen en el lado dérmico⁶¹.

El método que más se ha extendido es la separación mediante NaCl 1M. La biopsia se incubaba de 48 a 72 horas en NaCl 1M, a 4°C y posteriormente se realiza la tinción habitual de inmunofluorescencia directa⁶²⁻⁶⁴.

En general en el penfigoide ampuloso, penfigoide gestacional y penfigoide de mucosas los depósitos se ven en el lado epidérmico, convencionalmente superior o "techo" de la hendidura artificial **(Figura 12)**. Los depósitos se corresponden con la localización del dominio extracelular del colágeno XVII y de NC16A, que contiene los epítomos más frecuentes reconocidos por los anticuerpos patogénicos. Como excepciones, en el penfigoide anti p-200 y en el penfigoide de mucosas anti-laminina 332 los depósitos están en el lado dérmico.

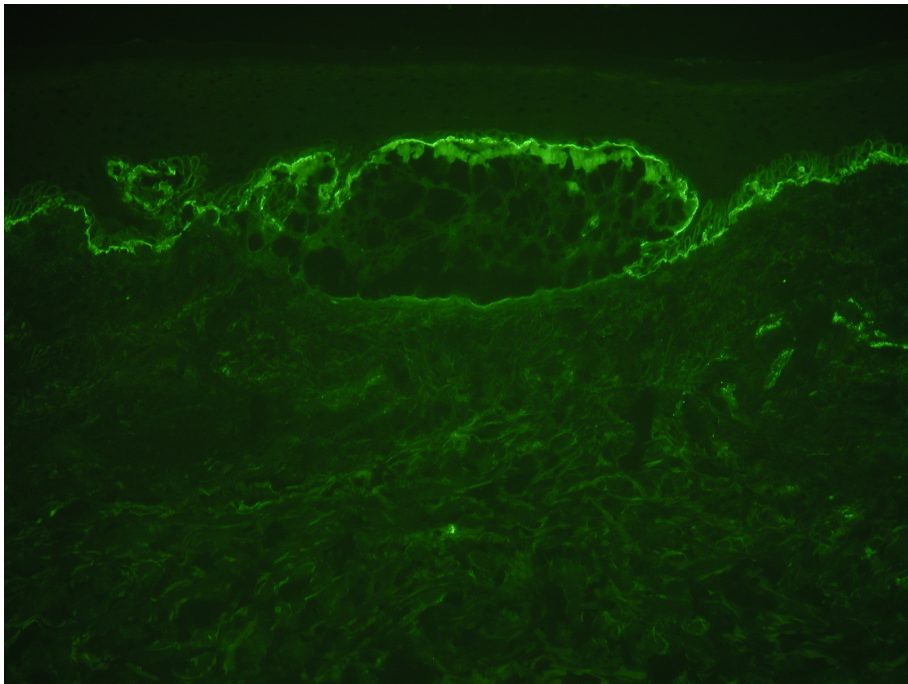


Figura 12

Inmunofluorescencia directa de piel separada en NaCl 1M: depósito en el lado epidérmico de separación en penfigoide ampuloso.

Los depósitos en la EAA y en el LEA se ven en el lado dérmico de la separación. Están situados en la sublámina densa, donde se sitúa el colágeno VII (**Figura 13**).

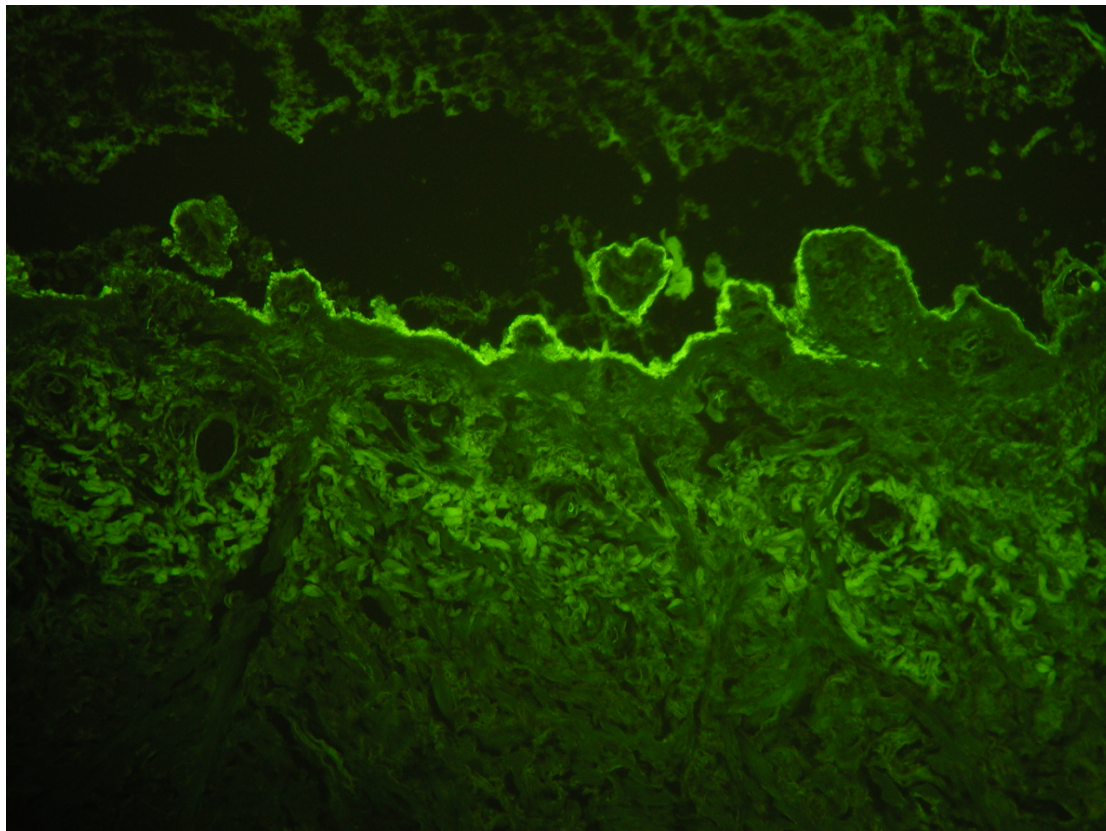


Figura 13

Inmunofluorescencia directa de piel separada en NaCl 1M: depósito en el lado dérmico de separación en epidermolísis ampollosa adquirida

En la dermatosis IgA lineal es más frecuente la localización en el lado epidérmico pero también hay una forma que marca en el lado dérmico, asociada a reactividad contra el colágeno VII.

Los hallazgos de inmunofluorescencia directa de cada enfermedad se resumen en la **tabla 2**.

ENFERMEDAD	Inmunofluorescencia directa	Tipo de depósito	IFD piel separada NaCl 1M
PENFIGOIDE AMPOLLOSO	Lineal Membrana basal	IgG y/o C3 ±IgA	Epidérmico o ambos lados
PENFIGOIDE GESTACIONAL	Lineal Membrana basal	IgG y/o C3	Epidérmico
PENFIGOIDE ANTI-P200	Lineal Membrana basal	IgG y/o C3	Dérmico
PENFIGOIDE DE MUCOSAS Penfigoide anti-laminina 332	Lineal Membrana basal	IgG y/o IgA y/o C3	Epidérmico o ambos lados Dérmico
EPIDERMÓLISIS AMPOLLOSA ADQUIRIDA	Lineal Membrana basal	IgG ±IgA±C3	Dérmico
DERMATITIS HERPETIFORME	Granular en papilas dérmicas y membrana basal	IgA	
DERMATOSIS IGA LINEAL	Lineal Membrana basal	Ig A±C3	Epidérmico. Algunos casos dérmico.
LUPUS ERITEMATOSO AMPOLLOSO	Lineal o granular Membrana basal	IgG ±IgA±C3	Dérmico

Tabla 2

Patrones de inmunofluorescencia directa convencional y en piel separada de las distintas enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes.

1.6.1.2. Inmunomicroscopía electrónica

La inmunomicroscopía electrónica es una variante de la microscopía electrónica en la cual se marcan los depósitos autoinmunes con un material electrodenso. El concepto es similar al de la inmunofluorescencia directa con la diferencia de que el último marcador es oro que resulta denso al haz de electrones.

En penfigoide ampollas se ve en la mayoría de casos IgG en el lado extracelular de la membrana plasmática del queratinocito

basal, bajo los hemidesmosomas, compatible con la localización del segmento NC16A del colágeno XVII.

Es una técnica muy poco utilizada para el diagnóstico.

1.6.2.Detección de autoanticuerpos en suero.

Los autoanticuerpos contra las proteínas de la unión dermoepidérmica no se encuentran solo en la piel. También es posible detectarlos en suero, orina y saliva^{66,67}. Se han desarrollado distintas técnicas para la detección y clasificación de estos autoanticuerpos que detallamos a continuación.

1.6.2.1.Inmunofluorescencia indirecta

Por inmunofluorescencia indirecta se entiende el conjunto de técnicas en las que el suero o exudado se incuba con un tejido sano con todas las estructuras moleculares conservadas^{68,69}. Se han usado como sustrato piel humana normal, esófago de mono. La sensibilidad y especificidad en cada caso depende del sustrato y del tipo de patología. Las imágenes obtenidas son semejantes a las de la inmunofluorescencia directa y se interpretan siguiendo los mismos criterios.

1.6.2.1.1.Inmunofluorescencia indirecta convencional

El suero del paciente se extrae por centrifugación. Se incuba el sustrato (tejido sano) con el suero problema 30 minutos. Tras lavado se incuba con anti-inmunoglobulina humana marcada con un fluorocromo. En una variante, poco usada, se incuba el sustrato-suero con complemento, y después con anti-C3 humano. .

a)Depósitos de IgG

Se encuentran anticuerpos IgG anti-membrana basal en penfigoide ampuloso, penfigoide de mucosas, penfigoide gestacional, EAA y LEA, con prevalencia variable. En penfigoide gestacional solo es positiva en el 10%, en el penfigoide de mucosas en el 10-25%. La sensibilidad sube al 60-80% en penfigoides ampollosos y al 50% en EAAs. En el LEA solo se detectan anticuerpos sobre piel separada (ver más adelante).

El patrón de fluorescencia no ayuda al diagnóstico diferencial. Los títulos de anticuerpos determinados mediante esta técnica no se correlacionan con la actividad en penfigoide ampuloso.

b)Depósitos de IgA

Se encuentran IgA anti-membrana basal en la dermatosis ampullosa IgA lineal entre un tercio y la mitad de los pacientes. La sensibilidad aumenta en piel humana separada en NaCl 1M (ver más adelante). Los títulos son bajos.

En dermatitis herpetiforme hay anticuerpos antiendomiso que se unen al músculo liso hasta en el 70% de los pacientes que no siguen la dieta sin gluten.

En algunos casos de penfigoide ampuloso pueden detectarse IgA, siempre con IgG.

1.6.2.1.2.Inmunofluorescencia indirecta sobre piel separada

Una variante de inmunofluorescencia indirecta consiste en separar la piel sana en NaCl 1M, como en la IFD⁷⁰⁻⁷⁴. Aumenta la

sensibilidad en todas las enfermedades y es la única manera de visualizar anticuerpos en el LEA. En el penfigoide ampolloso la sensibilidad llega al 90%.

En penfigoide ampolloso, penfigoide gestacional y muchos penfigoides de mucosas se visualizan anticuerpos en el techo de la hendidura artificial. En epidermólisis ampollosa adquirida, penfigoide de mucosas antiepiligrina, penfigoide anti-p200 y lupus eritematoso ampolloso la fluorescencia se localiza en el suelo de la hendidura. En IgA puede aparecer fluorescencia en cualquiera de los dos lados.

1.6.2.1.3. Inmunofluorescencia indirecta sobre sustratos deficitarios

Se trata de una técnica poco empleada en la que el suero se incuba con piel patológica deficiente en proteínas conocidas (colágeno XVII o colágeno VII). Si la autoinmunidad es, por ejemplo, contra colágeno VII y se trata de una piel deficiente en colágeno VII no se detectará unión. Esta técnica tiene grandes limitaciones^{37,75}.

1.6.2.1.4. Microscopía inmunoeléctronica indirecta

Consiste en estudiar bajo el microscopio electrónico piel sana incubada con suero problema, con los depósitos autoinmunes convenientemente marcados. En el penfigoide ampolloso se ve cómo se unen los anti-BP230 a la placa hemidesmosómica y los anti-colágeno XVII a lámina lúcida bajo hemidesmosomas en

penfigoide ampolloso. En penfigoide de mucosas se ha visto densidad en lámina densa y lámina lúcida inferior.

En EAA se ven partículas de oro a lo largo de las fibrillas de anclaje.

1.6.2.2.ELISA

ELISA es un acrónimo de *enzyme-linked immunosorbent assay* (inmunoabsorción ligada a enzimas). Existen distintas variantes del ELISA según se quiera detectar antígenos o anticuerpos. Para detectar autoanticuerpos se emplea el ELISA indirecto, en el que los pocillos tienen el antígeno fijo. La técnica se ve en la **figura 14** y se puede resumir en los siguientes pasos^{76,77}.

1. Cada pocillo se incuba con diluciones de sueros problema y sueros control. Según la concentración de autoanticuerpos en el suero problema se producirá mayor o menor unión antígeno-anticuerpo, que se puede cuantificar⁷⁸ d.
2. Se añade como anticuerpo secundario antiinmunoglobulina humana de origen animal conjugada con peroxidasa.
3. El grado de unión anticuerpo secundario-anticuerpo primario se cuantifica tras lavado añadiendo un sustrato para la peroxidasa. Si ha habido mucha unión, habrá mayor cantidad de peroxidasa en el pocillo y por tanto se producirá mayor producto de la reacción enzimática.
4. La reacción se para en un tiempo predeterminado
5. La cantidad de producto es proporcional a la absorbancia del pocillo.

Como ventajas, no utiliza antígenos desnaturalizados, es rápida, sensible y permite analizar múltiples sueros a la vez.

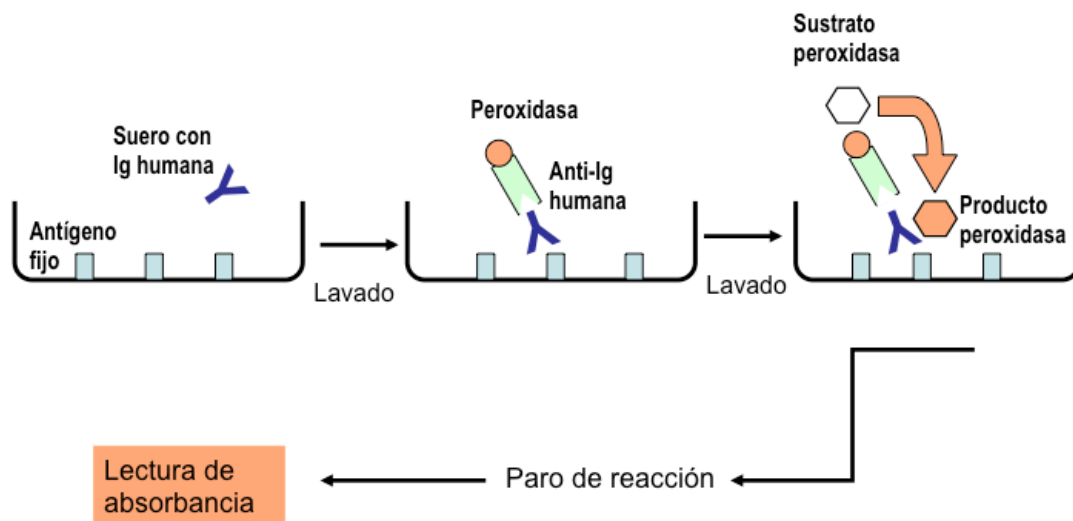


Figura 14
Técnica del ELISA indirecto

Existen varios kits comerciales. El más utilizado detecta anticuerpos contra el segmento NC16A del colágeno XVII⁷⁹⁻⁸². En la fase sólida de los pocillos hay NC16A de origen recombinante. En penfigoide ampolloso el ELISA contra NC16A tiene una sensibilidad del 94% y especificidad del 97%⁸³⁻⁸⁶. En penfigoide gestacional la sensibilidad se acerca al 100%. En cambio, el ELISA frente al colágeno XVII completo (también comercializado) solo es positivo en el 66,6% de los pacientes. Hay que tener en cuenta que la negatividad de este ELISA frente a BP180 no descarta el penfigoide ampolloso⁸⁷.

Se ha demostrado correlación de los títulos de anticuerpos contra NC16A con la actividad de la enfermedad y la respuesta terapéutica⁸⁸⁻⁹⁴, lo que no ocurre con la inmunofluorescencia

indirecta. Esto se atribuye a que la inmunofluorescencia indirecta detecta también anticuerpos contra BP230 junto a anticuerpos contra colágeno XVII. El ELISA para BP230 no añade sensibilidad al de BP180 e incrementa los costes.

Hay también un ELISA para el dominio NC1 del colágeno VII que ha demostrado ser sensible y específico para EAA y LEA⁹⁵.

En dermatitis herpetiforme se realiza ELISA para detectar anticuerpos antitransglutaminasa y antiendomiso.

1.6.2.3. Inmunoblot

El término *blot* (mancha, borrón) se aplica un conjunto de técnicas de biología molecular en las que se realiza transferencia desde un gel de electroforesis a una membrana donde se pueden visualizar los resultados o realizar incubaciones posteriores. El *southern blot* analiza DNA, el *northern blot* analiza RNA y el *western blot* analiza proteínas⁹⁶. Lo que se conoce como *inmunoblot* es un tipo de *western blot* en el que tras separar extractos proteicos de un tejido determinado estos se depositan sobre una membrana que se incuba con el suero problema que contiene potenciales autoanticuerpos^{97,98}.

El objetivo del *inmunoblot* en la patología ampollosa autoinmune es detectar contra qué proteínas dermoepidérmicas reaccionan anticuerpos en el suero.

El procedimiento tiene varias fases:

1. Purificación de extractos proteicos: las proteínas pueden tener varios orígenes: extractos proteicos de piel sana (dérmicos o epidérmicos), extractos proteicos de cultivos celulares o proteínas recombinantes obtenidas en bacterias.
2. Electroforesis: las proteínas se separan según su masa molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida.
3. Transferencia: una vez separadas las proteínas, se transfieren del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa también por un sistema electroforético.
4. Incubación: la membrana de nitrocelulosa se incuba con los sueros problema y los sueros control.
5. Revelado: tras la incubación, los resultados pueden visualizarse por varios métodos. El más utilizado utiliza anticuerpos antiinmunoglobulina humana unidos a fosfatasa alcalina o peroxidasa y adición del sustrato enzimático adecuado. También se puede revelar mediante incubación con Proteína A estafilocócica marcada con I^{125} y autorradiografía

Los extractos dérmicos contienen el colágeno VII, sus fragmentos y el antígeno de 200 kDa identificado en el penfigoide anti-p200. Interesan para estudiar la epidermólisis ampollosa adquirida, lupus eritematoso ampollosa, algunos casos de dermatosis IgA lineal y el

penfigoide anti-p200⁹⁹⁻¹⁰⁷. Los extractos epidérmicos son útiles para el resto de enfermedades.

En penfigoide ampolloso el inmunoblot reconoce 2 antígenos principalmente: uno de 230 kDa corresponde a BP230 y otro de 180 kDa que corresponde al colágeno tipo XVII. Dentro del colágeno XVII se reconoce con alta frecuencia el segmento NC16A y existen algunos casos de reconocimiento de LAD-1 (120 kDa). Hay casos esporádicos de reactividad a la plectina (500 kDa).

En penfigoide de mucosas se ha visto reactividad frente al colágeno XVII (NC16A, LAD-1 y BP180 4575), BP230, subunidades $\alpha 6$ y $\beta 4$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$, laminina 332 y laminina 6^{108,109}.

En la dermatosis IgA lineal se marca con más frecuencia LAD-1, aunque puede detectarse positividad contra otros segmentos del colágeno XVII y contra el colágeno VII.

En EAA, sobre extractos dérmicos se detecta una banda positiva de 290 kDa y más raramente de 145 kDa, que corresponden a colágeno VII y su fragmento NC1 N-terminal. Hay dos casos con reactividad doble frente al colágeno VII y la proteína de 200 kDa identificada en el penfigoide anti-p200 que pueden considerarse EAAs con fenómeno de expansión de epítomos.

La desventaja del *inmunoblot* es que al tener que desnaturalizar las proteínas, se pierden puntos de unión antígeno-anticuerpo denominados epítomos conformacionales. Esto hace bajar la sensibilidad de la técnica y aumenta el número de falsos negativos.

1.6.2.4. Inmunoprecipitación

Existe una técnica que no desnaturaliza las proteínas denominada *inmunoprecipitación*, que es más compleja y lenta que el inmunoblot y por tanto se usa fundamentalmente en investigación⁷⁷. Exige solubilizar cada proteína por separado y detectar por separado la precipitación de los posibles complejos antígeno-anticuerpo que se forman al poner en contacto extractos proteicos purificados y suero problema. Se ha utilizado más en el grupo del pénfigo. En enfermedades ampollosas subepidérmicas no resulta idónea para estudiar el colágeno XVII por tratarse de una proteína transmembrana difícil de solubilizar pero ha demostrado utilidad en el pénfigoide antiepiligrina para la detección de autoanticuerpos contra la laminina 5.

1.7. MICROSCOPIA CONFOCAL

1.7.1. Generalidades

El término *confocal* se refiere un sistema óptico presente en dispositivos muy distintos (microscopía convencional, microscopía de inmunofluorescencia, microscopía *in vivo*) que permite eliminar los artefactos por superposición al permitir solamente el paso de la luz reflejada desde un único plano y eliminar la luz procedente de puntos fuera de foco (**Figura 15**). El efecto puede compararse al de un microtomo óptico (**Figura 16**)

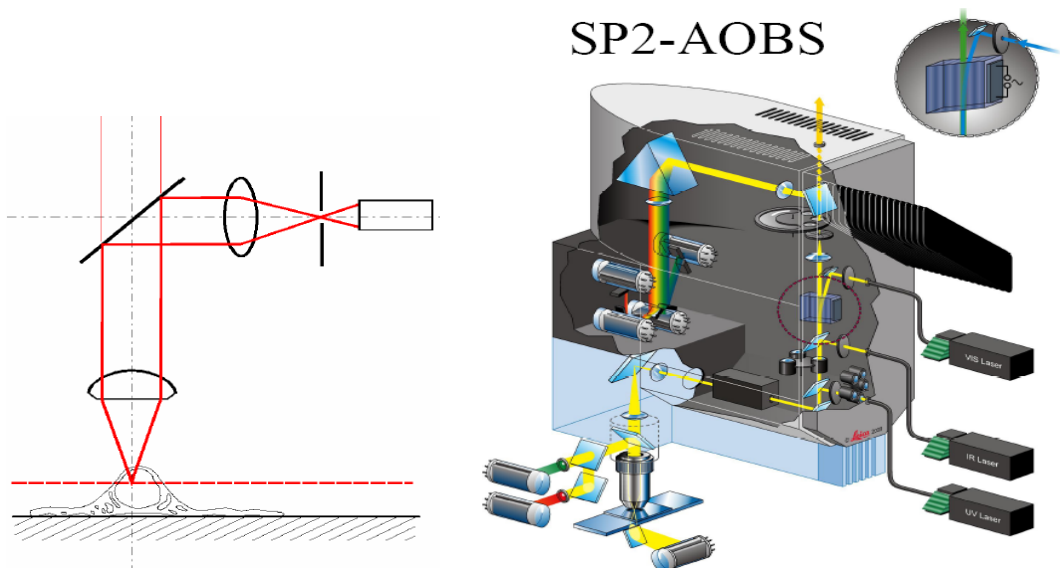


Figura 15

a) Esquema de las bases ópticas de la microscopía confocal

b) Esquema de un microscopio confocal espectral láser

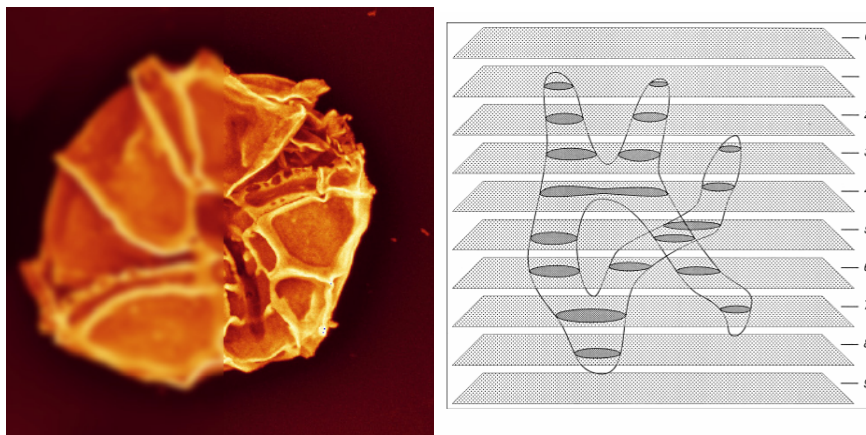


Figura 16

La microscopía confocal elimina los artefactos debidos a la superposición de estructuras y crea “cortes ópticos” de las muestras estudiadas.

El microscopio confocal espectral es un microscopio de fluorescencia sofisticado¹¹⁰. En lugar de observar directamente a través de los oculares, un software procesa las imágenes y realiza reconstrucciones. El microscopio confocal de barrido de láser (**CLSM**: *Confocal Laser Scanning Microscope*) ha revolucionado el campo de la investigación básica y aplicada a la biomedicina en los

últimos veinte años¹¹¹. Los aparatos se han ido perfeccionando constantemente hasta el desarrollo de los potentes CLSM actuales **(Figura 17)**.



Figura 17

Imagen de un moderno microscopio confocal de barrido de láser

A diferencia de los microscopios de fluorescencia convencionales, el CLSM o microscopio confocal espectral permite generar imágenes de gran resolución constituidas por un número arbitrario de colores desde el ultravioleta al rojo lejano del espectro (espectral), correspondientes a un estrecho plano focal (confocal) de una célula o tejido¹¹². El CLSM ofrece mayor poder de resolución y sensibilidad, menor ruido de fondo, capacidad de realizar 'cortes ópticos virtuales' y crear reconstrucciones tridimensionales de alta calidad (3D), evaluar cuantitativamente parámetros de la imagen, etc. Además, los CLSM permiten tratar las imágenes digitales como conjuntos de datos cuantitativos referidos a unidades básicas o

píxels, a las que se asignan porcentajes de cada uno de los parámetros de la muestra, en este caso colores. Estas dos últimas características de los CLSMs permiten analizar objetivamente la superposición de dos o más marcadores o colocación (**figura 18**)

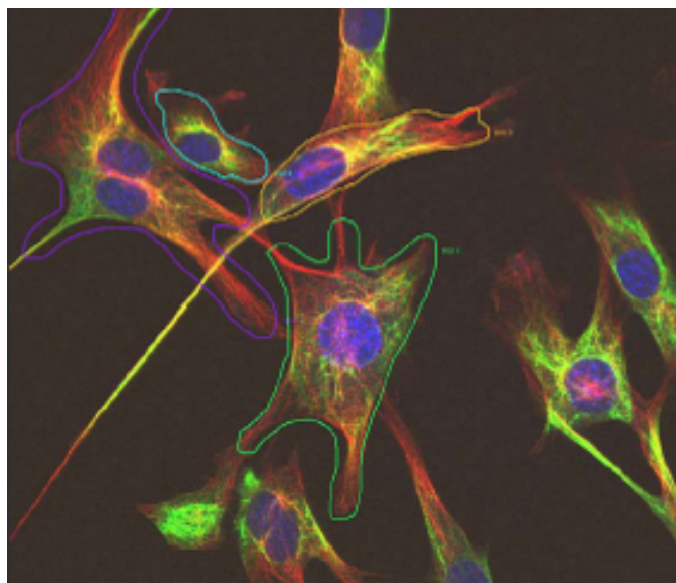


Figura 18

Ejemplo de imagen de colocación realizada con cuatro marcadores

1.7.2.La microscopía confocal aplicada al diagnóstico clínico

El potencial de este tipo de microscopio de fluorescencia no ha pasado desapercibido para el diagnóstico y la medicina clínica¹¹³. En los últimos diez años se ha producido una intensa actividad investigadora sobre el desarrollo de métodos de diagnóstico mediante CLSM. Sin embargo, el uso de los CLSM en la práctica clínica es todavía escaso en nuestro medio. Mientras que casi todos los centros de investigación cuentan con varios modelos de CLSM,

son pocos los hospitales que cuentan una Unidad de Confocal propia.

El Hospital Gregorio Marañón cuenta con una Unidad de Confocal que pese a su corta trayectoria (desde mediados de 2004) ha conseguido introducirse con éxito en el ámbito de la investigación biomédica, no sólo del propio centro sino que se ha convertido en unidad de referencia para investigadores de otros Hospitales y centros de investigación madrileños. Mientras que esta faceta científica se consolida día a día, no se debe desaprovechar la oportunidad de explorar nuevas ideas capaces de repercutir en una mejor labor asistencial, aplicando las nuevas tecnologías al diagnóstico.

1.7.3. Diagnóstico de enfermedades ampollas mediante microscopía confocal

La piel, por su estructura y accesibilidad, es un campo de gran interés en la microscopía confocal^{114,115}. En enfermedades ampollas el CLSM realiza cortes que permiten estudios de alta resolución de la morfología de los depósitos. El software permite analizar 2 o más fluorocromos simultáneamente, realizar superposiciones de imágenes y visualizar el área de colocación de proteínas seleccionadas. La colocación de proteínas y anticuerpos puede visualizarse e incluso realizar un análisis numérico.

Una de las técnicas descritas en el diagnóstico de enfermedades ampollosas mediante microscopía confocal se denomina FOAM (*fluorescent overlay antigen mapping*) cuyo objetivo es comparar la localización de los depósitos autoinmunes con antígenos conocidos de la membrana basal que elegimos como marcadores, tras realizar una doble tinción¹¹⁵⁻¹²³. Las proteínas marcadoras elegidas con mayor frecuencia son el colágeno VII, colágeno IV, laminina y subunidad $\beta 4$ de integrina $\alpha 6\beta 4$ (**Figura 19**).

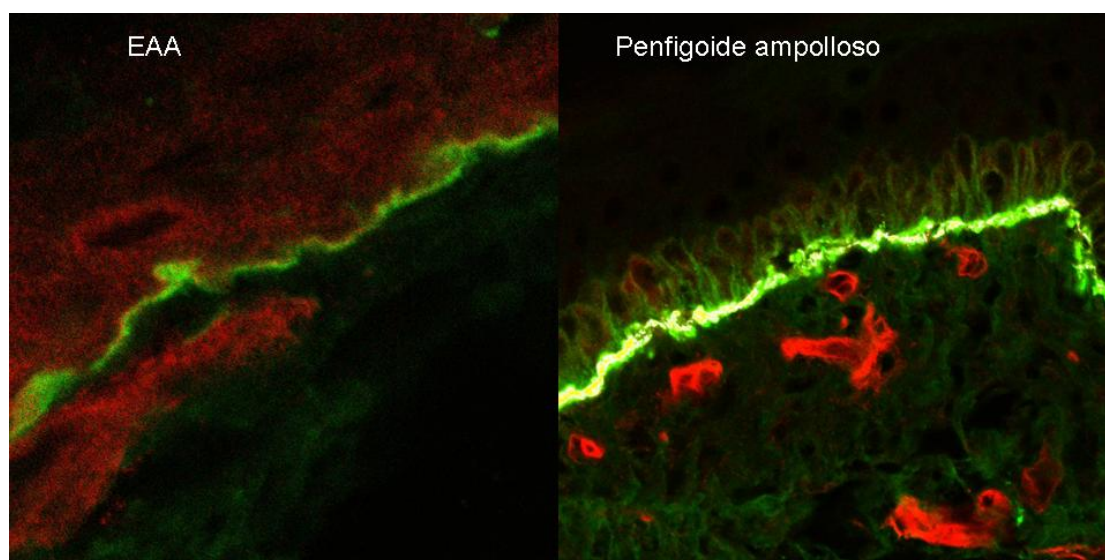


Figura 19

FOAM mediante microscopía confocal. Estudio de colocalización de $\beta 4$ integrina con depósitos autoinmunes. En EAA se observa una nítida banda verde de IgG situada inferior a la integrina (roja) en consonancia con la situación del colágeno VII. En un caso de penfigoide ampolloso se encuentra colocalización de $\beta 4$ integrina con los depósitos autoinmunes, lo cual concuerda con autoinmunidad contra colágeno XVII.

Hipótesis y objetivos

2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo aplicar la microscopía confocal al diagnóstico rutinario de enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes (EASA), el grupo más frecuente en nuestro medio y de mayor complejidad diagnóstica. El desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunológico sensibles, específicas y reproducibles hará que los diagnósticos en el campo de las EASA sean más precisos y por tanto el manejo terapéutico de los enfermos sea mejor.

Previamente al desarrollo del trabajo, el diagnóstico de EASA se realizaba mediante las técnicas de IFD, IFD en piel separada (Anatomía Patológica) e IFI (Inmunología). En este proyecto pretendemos evaluar las posibilidades reales de la aplicación de microscopía confocal al diagnóstico rutinario de las EASA.

2.1.Hipótesis

1. La microscopía confocal puede mostrar patrones diferenciales en las distintas enfermedades autoinmunes subepidérmicas
2. La FOAM (*fluorescent overlay antigen mapping*) mediante microscopía confocal tiene mayor sensibilidad para el diagnóstico de EASA que la combinación de las técnicas histopatológicas de rutina realizadas en nuestro centro y en la mayoría de hospitales de tercer nivel (inmunofluorescencia

directa convencional e inmunofluorescencia directa de piel separada).

3. Una Unidad de Confocal hospitalaria tiene capacidad y flexibilidad suficientes para compaginar la función investigadora con la asistencial, bien rutinaria, bien en casos específicos en los que el diagnóstico convencional sea complejo.

2.2. Objetivos

1. Estudio piloto: determinar los patrones de microscopía confocal de cada enfermedad ampollosa subepidérmica. Para ello será necesario probar y seleccionar los antígenos más eficaces para marcar los diferentes niveles de la membrana basal. También será necesario elegir el inmunomarcaje para los autoanticuerpos y el complemento. Se testarán todas las tinciones elegidas en un caso de penfigoide ampollosa, de dermatosis ampollosa IgA lineal, de epidermólisis ampollosa adquirida y de lupus eritematoso ampollosa
2. Estudio de los patrones de colocación de la β 4-integrina en las distintas EASA.
3. Estudio de los patrones de colocación de la laminina en las distintas EASA.
4. Estudio de los patrones de colocación del colágeno IV en las distintas EASA.

5. Estudio mediante microscopía confocal de una serie de pacientes con penfigoide ampoloso en condiciones de práctica clínica habitual
6. Estudio mediante microscopía confocal de una serie de pacientes con dermatosis ampollosa IgA lineal en condiciones de práctica clínica habitual.
7. Descubrir nuevas aplicaciones del software del CLSM en el estudio de las EASA

Material y métodos

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.Diseño del estudio

Se trata de un estudio prospectivo en condiciones de práctica clínica habitual realizado en el contexto asistencial de un hospital de tercer nivel que es centro de referencia en enfermedades ampollosas y cuenta con Unidad de Microscopía Confocal.

3.2. Inclusión de pacientes (Sujetos del estudio):

Todos los pacientes referidos a la Unidad de Enfermedades Ampollosas del Hospital Gregorio Marañón, con sospecha de enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes (presencia de ampollas tensas y / o lesiones mucosas sugestivas) durante el período de estudio fueron invitados a participar en el estudio.

El reclutamiento de pacientes se prolongó durante un período de 3 años.

Para realizar este estudio se solicitó a los pacientes consentimiento informado por escrito, aprobado por el CEIC de centro, para la donación de una biopsia cutánea (punch de 3 mm de diámetro), conforme a la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica y al Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre. Estas muestras se conservan en el laboratorio de Inmuno-Oncología formando parte de la colección C.0001717, registrada en el Instituto de Salud Carlos III.

3.3. Toma de muestras

Las biopsias cutáneas fueron siempre realizadas de forma estándar por el mismo dermatólogo (M.C). En cada paciente se realiza estudio histopatológico convencional (una biopsia), estudio de inmunofluorescencia directa convencional (una biopsia), estudio de inmunofluorescencia directa en piel separada (una biopsia) y se toma una biopsia de piel perilesional de 3 mm para estudio mediante microscopía confocal.

3.4. Procesamiento y conservación de las muestras

La biopsia de piel perilesional de 3 mm para estudio mediante microscopía confocal es transportada en fresco al laboratorio de Inmuno-oncología del HGUGM. Se realiza la congelación del tejido, seguida de los criocortes y las tinciones de inmunofluorescencia previas al análisis mediante microscopio confocal.

4. Inmunomarcados (EEAs): Se realizan cortes de 4 μm de tejido conservado a -80°C , se fija en acetona y se incuba con anticuerpos monoclonales de ratón contra la β_4 -integrina (BD Transduction Laboratories), laminina (NCL-LAMININ, Novo Castra Ltd) o colágeno tipo IV (NCL-COLL-IV, Novo Castra Ltd). Después de un lavado en salino tamponado con Tris las muestras se incuban en la siguiente mezcla: anticuerpos caprinos contra IgG de ratón marcados con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) y anticuerpos caprinos contra IgG, IgA o C3 humanos marcados con

FITC (Master Diagnostica, Granada, Spain). Para todas las biopsias referidas a este estudio existe el estudio paralelo con técnicas convencionales (IF directa e indirecta, y/o de separación de piel con NaCl 1M realizadas por el departamento de Anatomía Patológica para emitir su juicio diagnóstico).

3.5. Estudio mediante microscopía confocal

Se realiza la técnica FOAM, que compara la localización de proteínas de la membrana basal (β_4 -integrina, laminina o colágeno tipo IV) con la localización de los depósitos autoinmunes (IgG, IgA o C3).

El tejido se visualiza en el microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 AOBS (*Leica Microsystems*) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Como se puede observar en la **figura 20**, en primer lugar se obtiene una imagen de grises sin utilizar los láseres, que sirve para orientar la pieza. Posteriormente se obtienen las imágenes monotincionales correspondientes a cada fluorocromo como se observa en la **figura 21**. Posteriormente, se superponen las imágenes mediante el software. Para el procesado de imagen y análisis de colocalización se utiliza software específico (LCS, MetaMorph, ImageJ, etc *Dye-separation, Leica Confocal Software*)

- Análisis del fluoro-histograma. El software permiten analizar cada píxel de una imagen asignándole un porcentaje de la intensidad total de cada fluorocromo en una región de interés analizada (ROI), representándola en forma de histograma sobre

el que se puede delimitar un área constante que se considerada significativa de co-localización, pseudo-colorear los píxeles del área seleccionada sobre la imagen y obtener información sobre la distribución de la colocación.

Análisis de los perfiles de intensidad. En cada imagen se pueden dibujar líneas que atraviesen la zona de estudio, asignando a cada píxel de la línea el valor de intensidad de fluorescencia de cada marcador. El resultado final son dos curvas superponibles donde cuantificar el área de colocación / superposición.

3.5.Análisis estadístico

Se comparan los resultados de sensibilidad de las técnicas de inmunofluorescencia directa convencional, inmunofluorescencia directa en piel separada y FOAM.

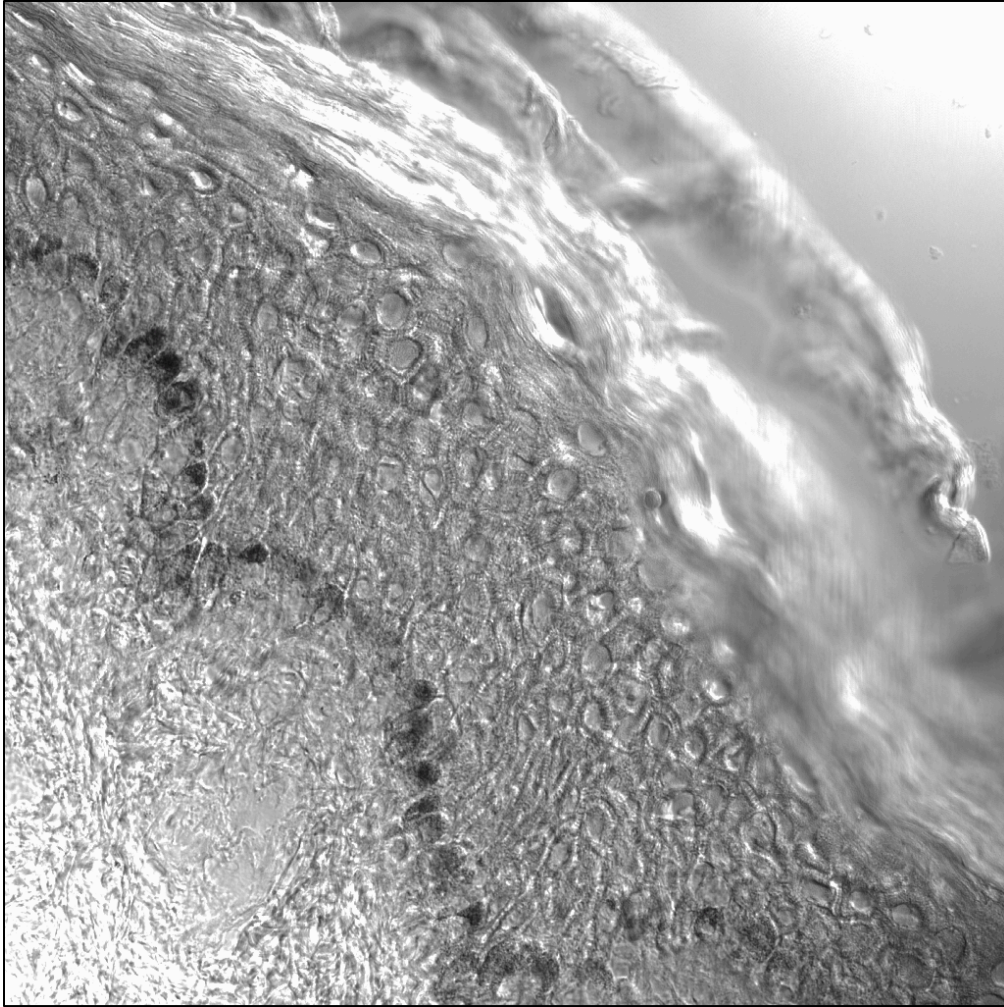


Figura 20:

Imagen tomada por el microscopio confocal sin el uso de láser, en la que se pueden observar la epidermis con sus distintas capas, la unión dermoepidérmica y la dermis.

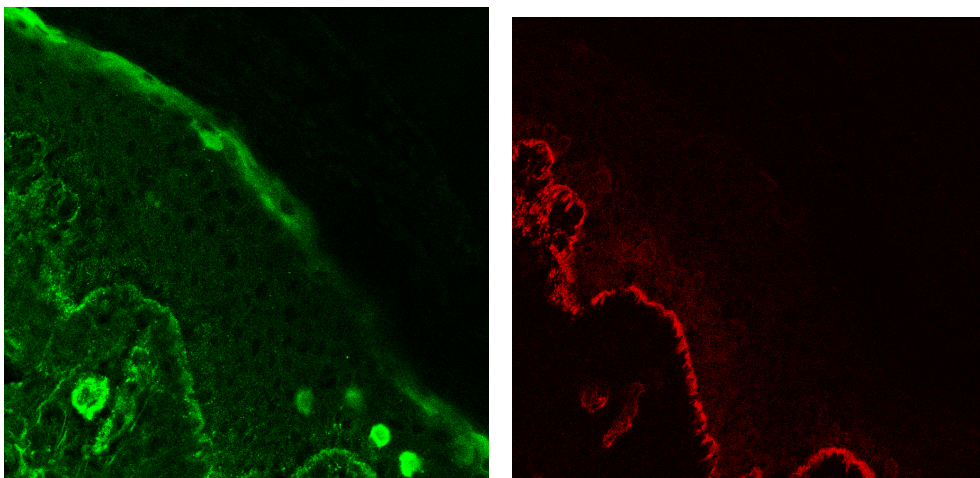


Figura 21:

Imágenes monotincionales correspondientes a la figura anterior. La imagen de grises es útil para orientar la imagen y localizar la epidermis y la dermis.

Resultados

4.RESULTADOS

Durante un período de 3 años, se recogieron biopsias de 44 pacientes con sospecha de enfermedad ampollosa subepidérmica autoinmune (EASA).

En todos los pacientes se realizó una exploración general, una exploración cutánea, un estudio histopatológico convencional, un estudio de inmunofluorescencia convencional, un estudio de inmunofluorescencia en piel separada y un estudio inmunológico del suero.

De los 44 pacientes, en 36 se confirmó la presencia de una enfermedad ampollosa autoinmune y en 8 se descartó enfermedad ampollosa autoinmune. En este grupo de 8 enfermos con trastornos no autoinmunes se diagnosticó a 5 pacientes de eccema y al resto de porfiria cutánea tarda, foliculitis y prúrigo.

De los 36 pacientes que padecían una enfermedad ampollosa autoinmune, se encontró que 2 tenían trastornos del grupo del pénfigo, es decir, una enfermedad ampollosa autoinmune intraepidérmica (un pénfigo vulgar y un pénfigo paraneoplásico).

Finalmente, los 34 pacientes con enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes fueron diagnosticados en 25 casos de penfigoide ampollosa, en 7 casos de dermatosis ampollosa IgA lineal, en 1 caso de lupus eritematoso ampollosa y en otro caso de epidermolísis ampollosa adquirida.

Los datos se resumen en la **figura 22**.

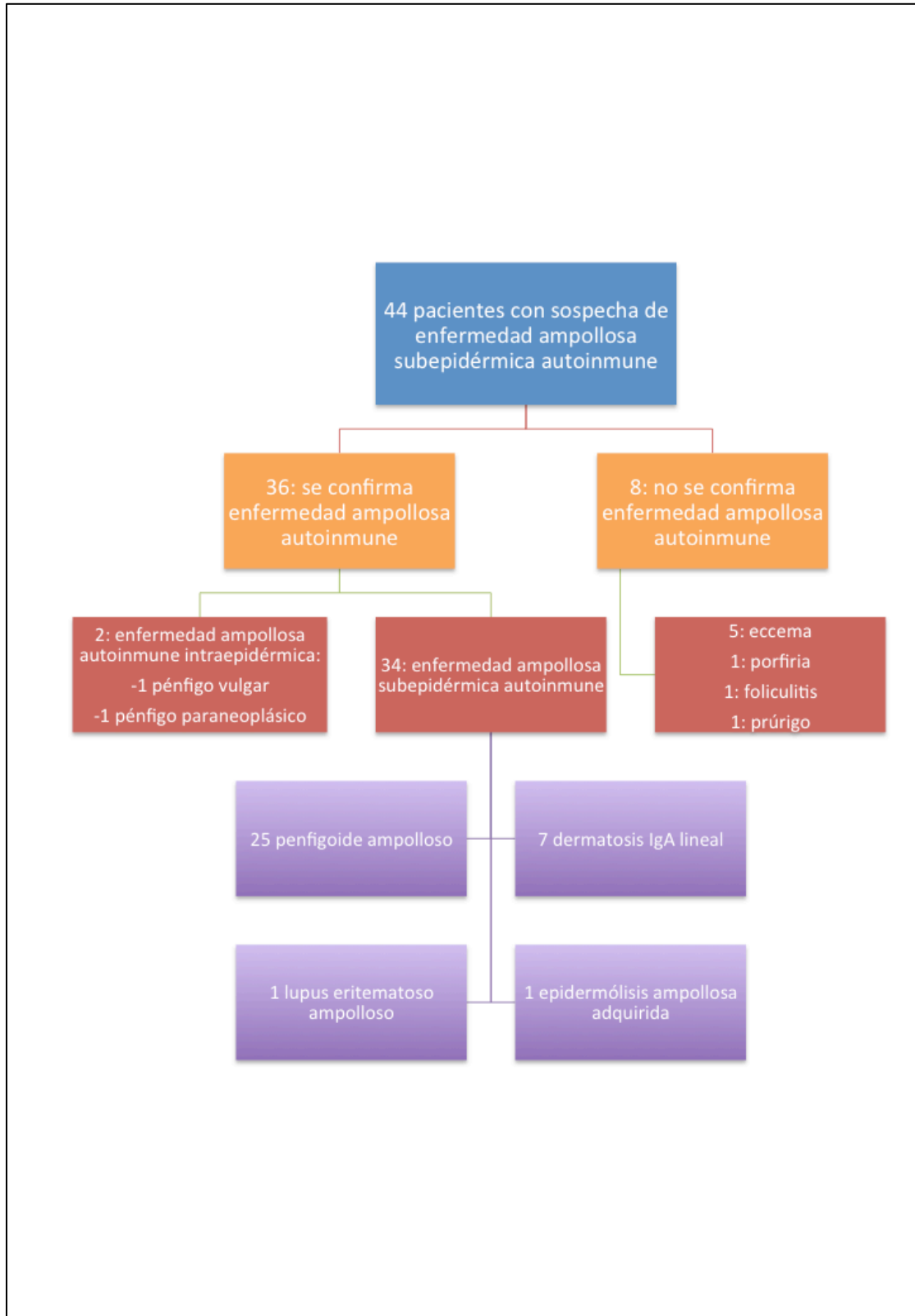


Figura 22:
Diagrama de flujo del estudio

4.1. Estudio piloto: patrones de tinción en las distintas enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes

Se realizó un estudio inicial para determinar los patrones de microscopía confocal de cada EASA.

Se estudiaron cuatro pacientes con diagnóstico confirmado de penfigoide ampolloso, dermatosis ampollosa IgA lineal, epidermólisis ampollosa adquirida y lupus eritematoso ampolloso

Las muestras de todos los pacientes se tiñeron para colágeno IV, laminina y β 4-integrina.

En el caso de penfigoide ampolloso, los depósitos de IgG se localizaron por encima del colágeno IV, entremezclados con laminina con un patrón moteado y mostraron un patrón de colocación con β 4-integrina. Esto es compatible con el depósito de anticuerpos frente a BP180, que se encuentra a la localización a la misma altura que β 4-integrina, con sus dominios extracitoplasmáticos en la lámina lúcida superior. Los resultados se muestran en la **figura 24**.

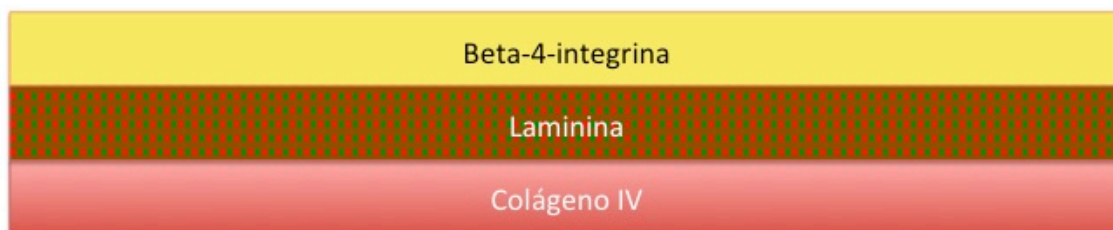
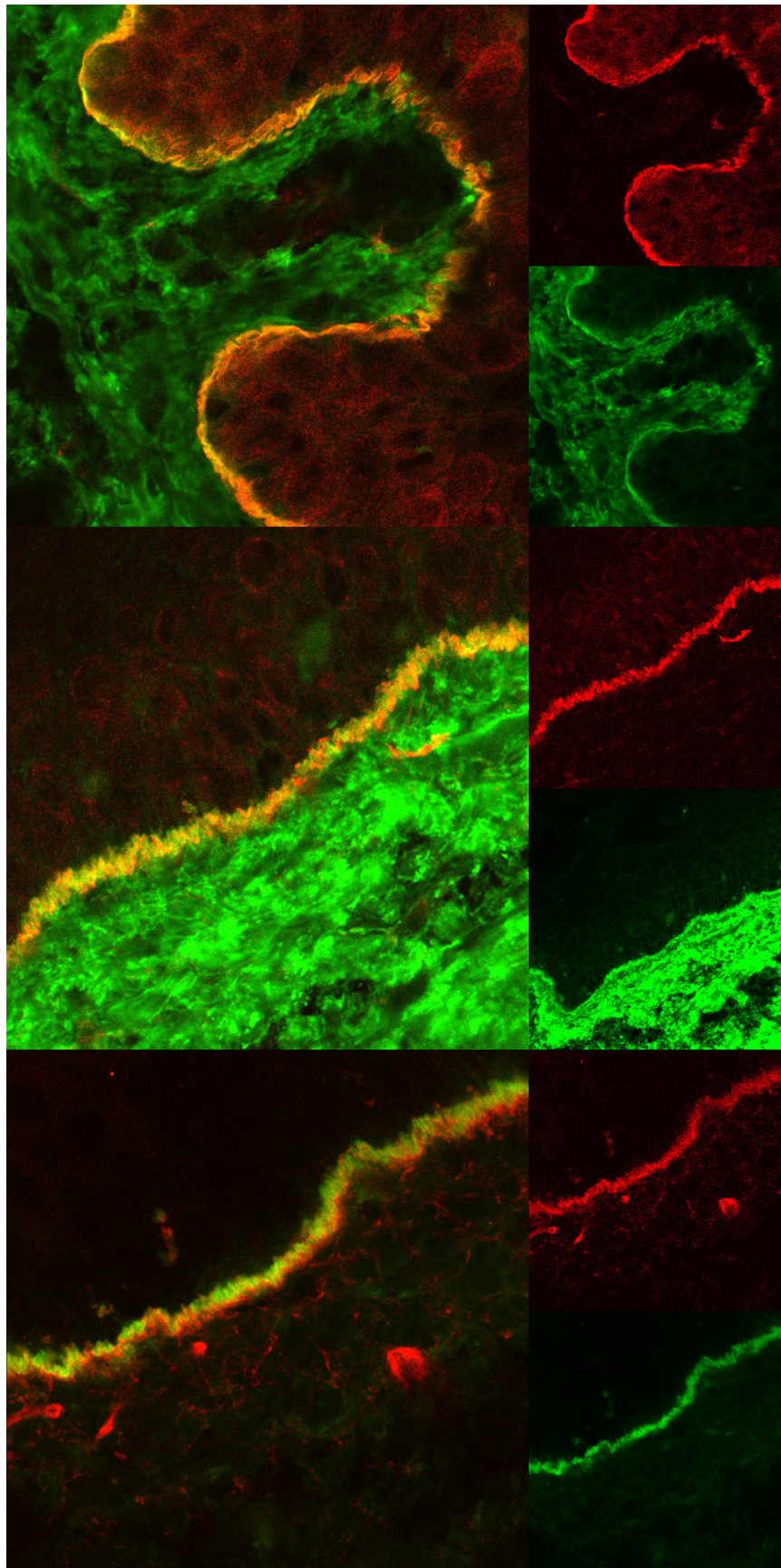


Figura 23:

Esquema de los depósitos en el penfigoide ampolloso. Existe una colocación total con β 4-integrina y una colocación parcial con laminina que se observa como un patrón moteado rojo y verde. El colágeno IV queda situado debajo de los depósitos.



Rojo: integrina
 Verde: IgG
 Suma:
 Banda amarilla
 (colocalización)

Rojo: laminina
 Verde: IgG
 Suma:
 Patrón moteado

Rojo: colágenoIV
 Verde: IgG
 Suma:
 Separación de bandas

Figura 24:
 Patrones de depósito y colocalización en un caso típico de penfigoide ampollosa

La **figura 27** compara los resultados obtenidos en la dermatosis ampollosa IgA lineal (DAIL) y en la epidermólisis ampollosa adquirida (EAA).

En el caso analizado de DAIL los depósitos de IgA se localizaron por encima del colágeno IV y mostraron colocalización tanto con laminina como con integrina. Se muestra un esquema en la **figura 25**. Esto sugiere afinidad por un antígeno de la lámina lúcida, como ha sido descrito en IgA lineal.



Figura 25:

En la dermatosis ampollosa IgA lineal los depósitos colocalizan en la lámina lúcida con β 4-integrina y laminina, pero con un patrón diferente al penfigoide ampollososo.

En el caso de EAA, enfermedad en la que el antígeno diana conocido es el colágeno tipo VII de la sublámina densa, los depósitos de IgG se localizaron por debajo del colágeno tipo IV, de la laminina y de la β 4-integrina, como se esquematiza en la **figura 26**.



Figura 26:

En la epidermólisis ampollosa adquirida el nivel de los depósitos (fluorescencia verde) corresponde con la localización del colágeno VII de la sublámina densa.

Dermatosis ampollosa IgA lineal

Epidermólisis ampollosa adquirida

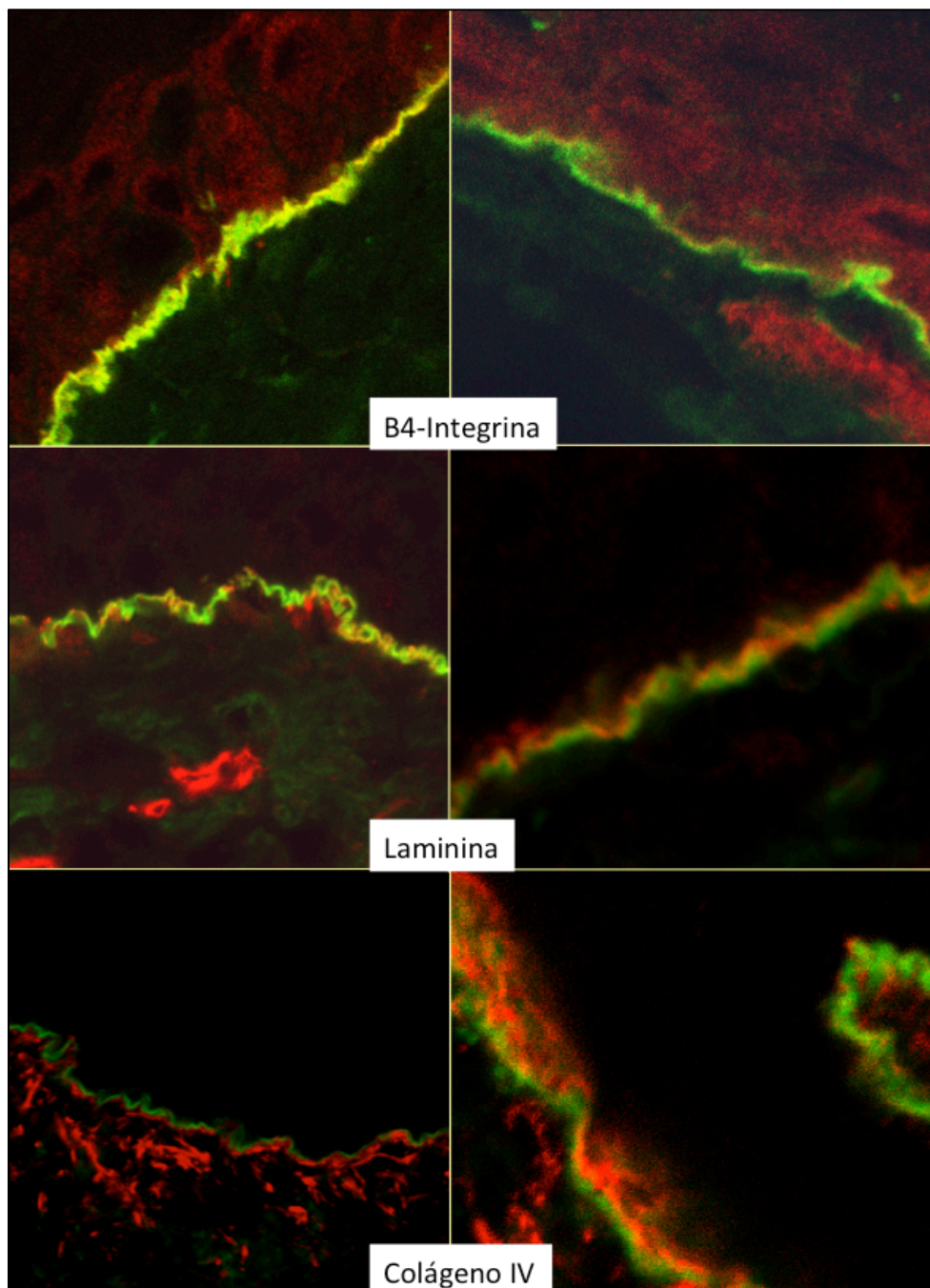


Figura 27:

En la columna izquierda se observa el caso de DAHL. En la DAHL los depósitos de IgA se localizaron por encima del colágeno IV y mostraron colocalización tanto con laminina como con la β 4-integrina. En la columna derecha se muestra el caso de EAA. Los depósitos de IgG se localizaron por debajo del colágeno tipo IV, de la laminina y de la β 4-integrina

En el caso de lupus eritematoso ampuloso analizado, los depósitos de IgG, IgA e IgM mostraron un patrón parecido al de la EAA, si bien con una mayor colocalización con el colágeno IV. También es típico de esta entidad la presencia de positividad frente a varios tipos de inmunoglobulina. Los hallazgos se esquematizan en la **figura 28** y se muestran en la **figura 29**.



Figura 28:

En el lupus eritematoso ampuloso se observa un depósito en la sublámina densa, pero con una cierta colocalización con el colágeno IV

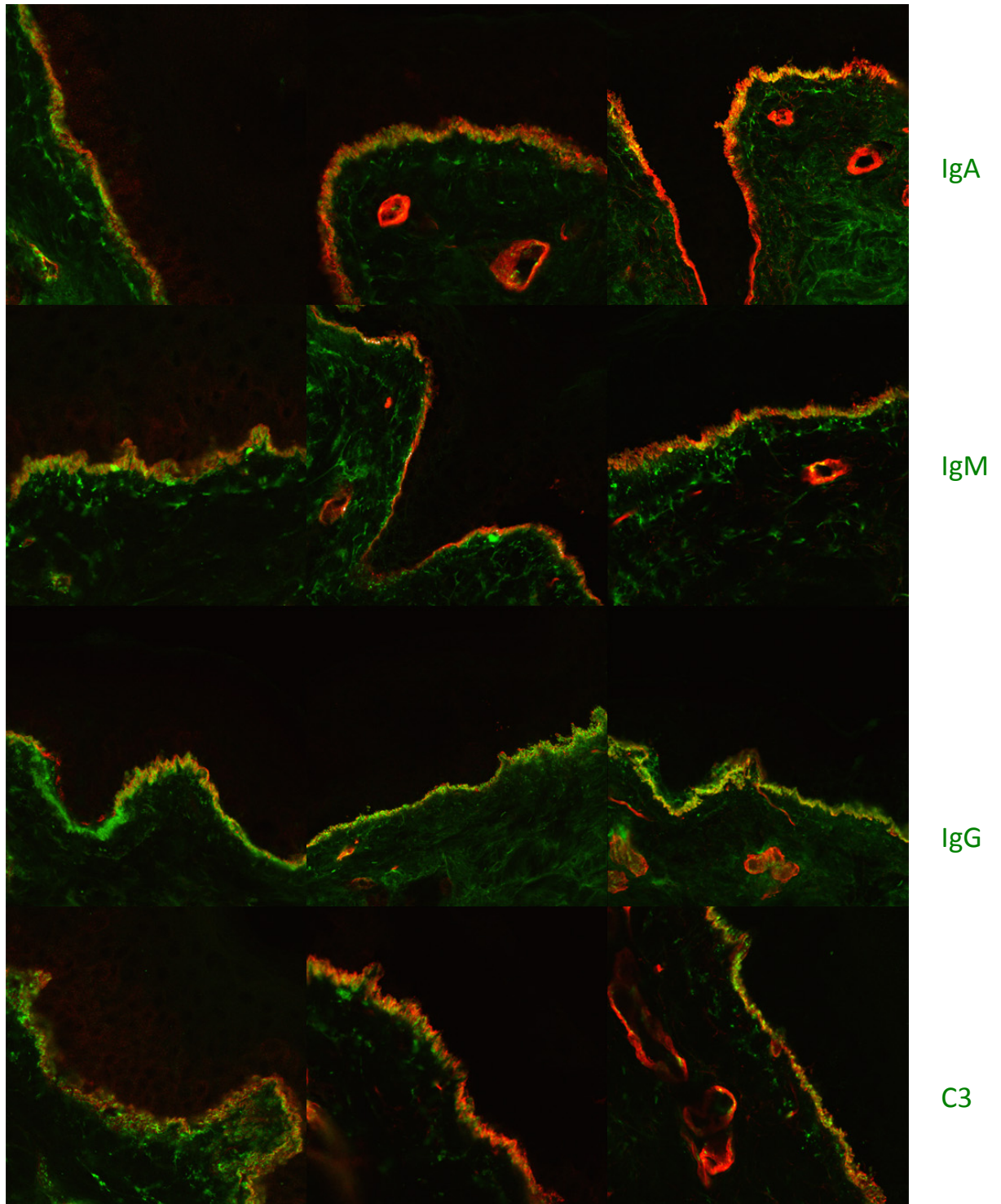
Como conclusión del estudio piloto, se confirmó la hipótesis de que la técnica FOAM (*fluorescent overlay antigen mapping*) realizada mediante microscopía confocal era sensible para detectar los depósitos autoinmunes en las enfermedades ampulosas subepidérmicas autoinmunes. Se encontraron hallazgos específicos en cada una de las distintas enfermedades analizadas, por lo que esta técnica se suma a las ya existentes para el diagnóstico diferencial de la EASA.

Como continuación del estudio, se procedió a estudiar en condiciones de práctica clínica habitual dos muestras de pacientes de penfigoide ampuloso y dermatosis ampullosa IgA lineal.

β 4-INTEGRINA

LAMININA

COLÁGENO IV



β 4-INTEGRINA

LAMININA

COLÁGENO IV

Figura 29:

Patrones de depósito y colocalización en un caso típico de lupus eritematoso ampolloso. Los depósitos se sitúan en la parte inferior de la membrana basal.

4.2. Estudio de una serie de penfigoide ampoloso mediante microscopía confocal en condiciones de práctica clínica habitual

4.2.1. Comparación con las técnicas convencionales

De los 25 pacientes con penfigoide ampoloso, se pudo realizar microscopía confocal en 22 de ellos. En los 25 pacientes se realizó además inmunofluorescencia directa (IFD) para IgG, IgA y C3 y estudio de inmunofluorescencia de piel separada mediante CINA 1M. Se consideró positiva la IFD si se encontraba una banda de fluorescencia lineal en la membrana basal. En la técnica de piel separada se exigió que la banda de fluorescencia quedase en el techo o en el suelo de la hendidura formada tras la incubación con CINA.

Los resultados se muestran en la **tabla 3**.

La inmunofluorescencia directa fue positiva para C3 en 23 de 25 casos (92%). Fue positiva para IgG en 17 de 25 casos (68%). Lógicamente, al tratarse de penfigoide ampoloso, la IFD IgA fue negativa en todos los casos. La técnica de inmunofluorescencia directa en piel separada solo obtuvo resultados diagnósticos en 13 de 25 casos (52%).

La microscopía confocal se pudo realizar en 22 de los 25 pacientes y consiguió el doble objetivo de detectar los depósitos autoinmunes y localizar su nivel en la membrana basal en el 100% de los casos. Por tanto, la sensibilidad más alta fue para la microscopía confocal.

Paciente	IFD C3	IFD IgG	Piel separada NaCl	Microscopía confocal
151	+	+	Techo	+
155	+	+	Techo	No realizado
157	+	+	Techo	+
161	+	-	No separación	+
163	+	-	Techo	+
173	+	-	No separación	+
176	+	-	Techo	+
178	+	+	Techo	+
179	+	+	No separación	+
180	+	-	No separación	+
181	+	+	Techo	+
185	+	+	Techo	+
187	+	+	Techo y suelo	+
189	+	+	No separación	+
191	+	+	No separación	+
196	+	+	No separación	+
197	+	+	Techo y suelo	+
199	-	+	No separación	No realizado
200	-	+	Suelo	+
204	+	-	Techo	+
208	+	-	Techo	+
209	+	+	No epidermis	+
213	+	-	No separación	+
214	+	+	Suelo	+
215	+	+	Techo	No realizado
Sensibilidad	23/25 (92%)	17/25 (68%)	13/25 (52%)	22/22 (100%)

Tabla 3 :
Comparación de los resultados de inmunofluorescencia (IFD) convencional, inmunofluorescencia en piel separada con NaCl y microscopía confocal

4.2.2. Patrones de marcaje de β 4-integrina en el penfigoide ampoloso

La parte extracelular β 4-integrina está localizada en la parte superior de la lámina lúcida y coincide espacialmente con BP180. Por tanto, se obtuvo de forma sostenida una imagen de colocación de β 4-integrina tanto con IgG como con C3 visualizada como una banda amarilla.

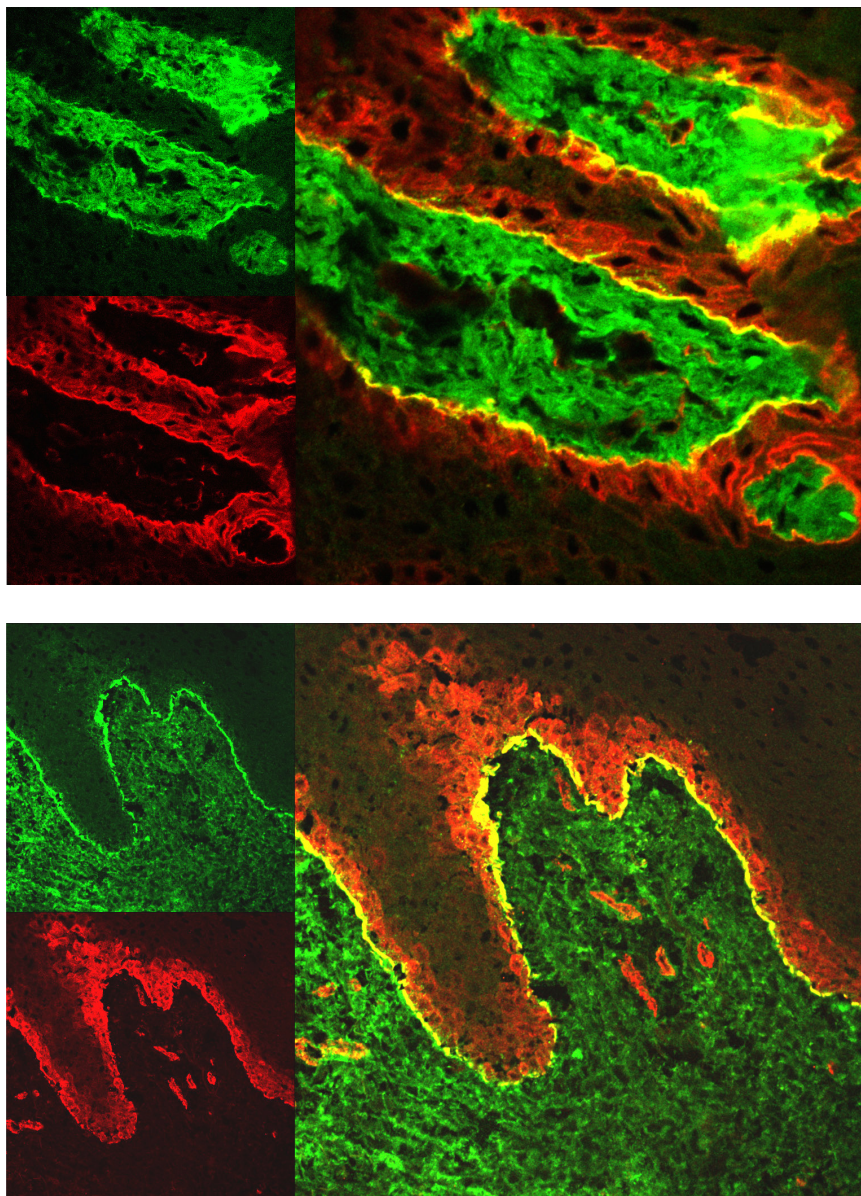


Figura 30:
Ejemplos de colocación de β 4-integrina con los depósitos autoinmunes en la membrana basal

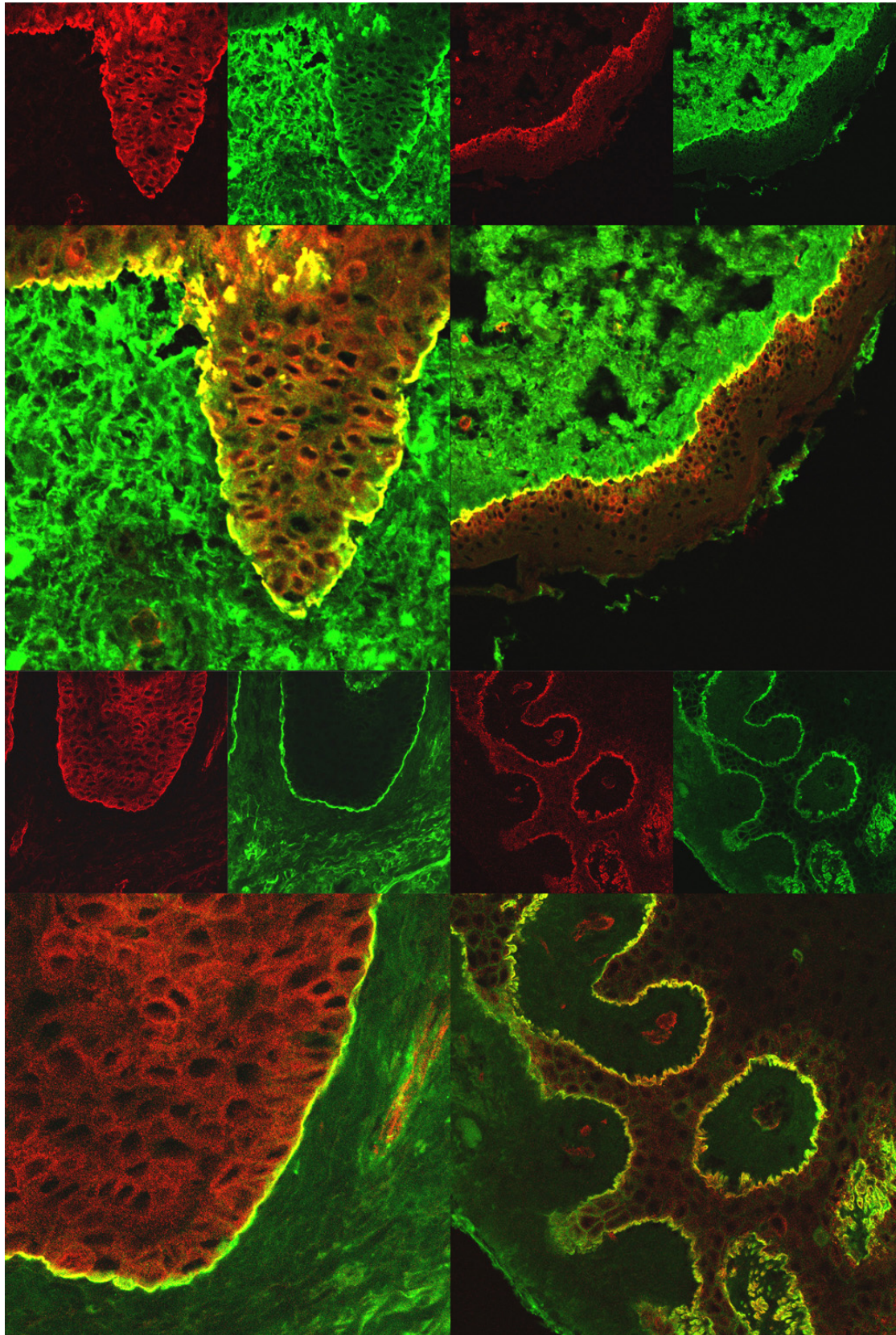


Figura 31:
Imágenes de 4 casos de penfigoide ampollosa en los que se observa una banda amarilla de colocalización entre los depósitos autoinmunes y la β 4-integrina

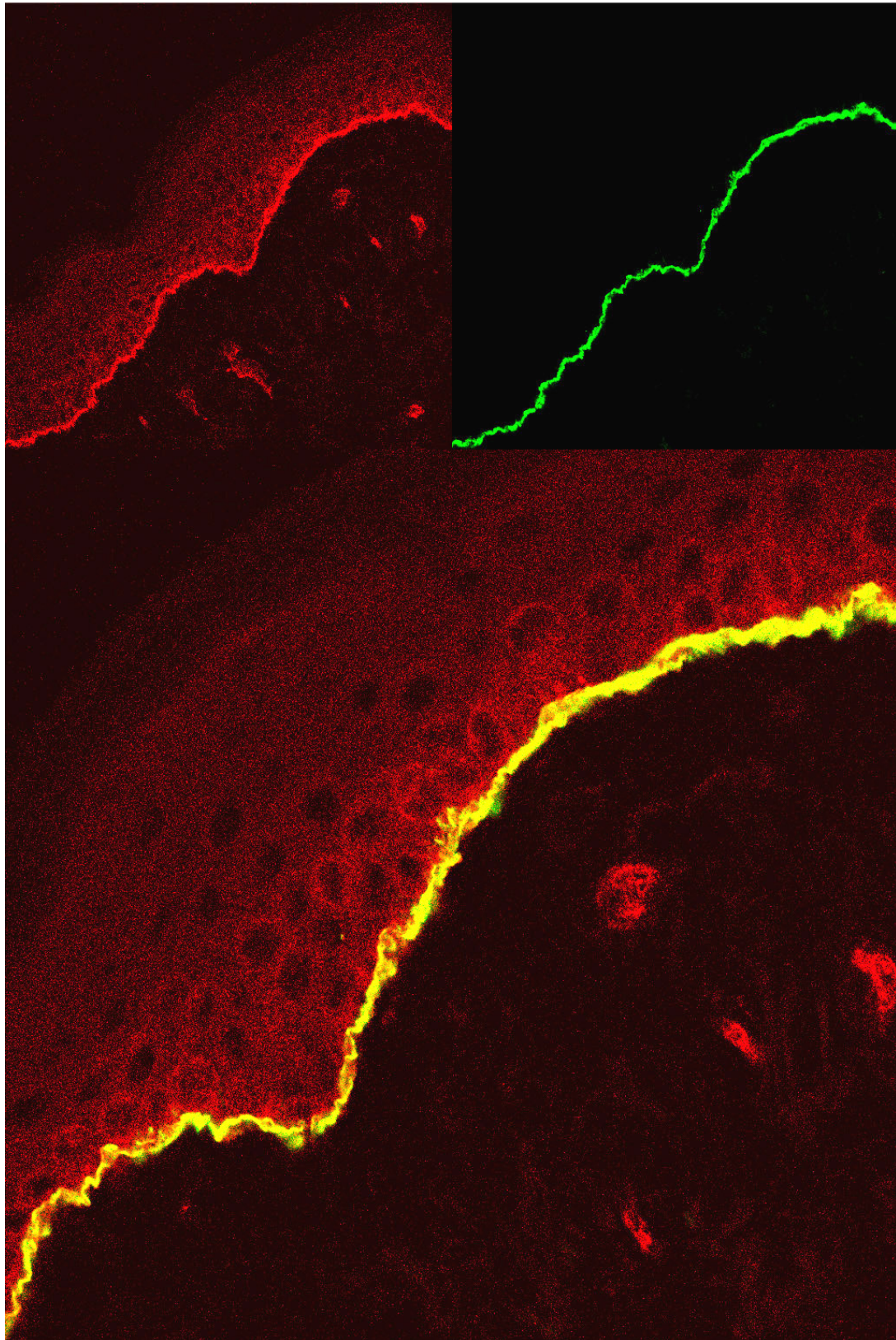


Figura 32:
Caso 187. Colocalización de C3 con β 4-integrina

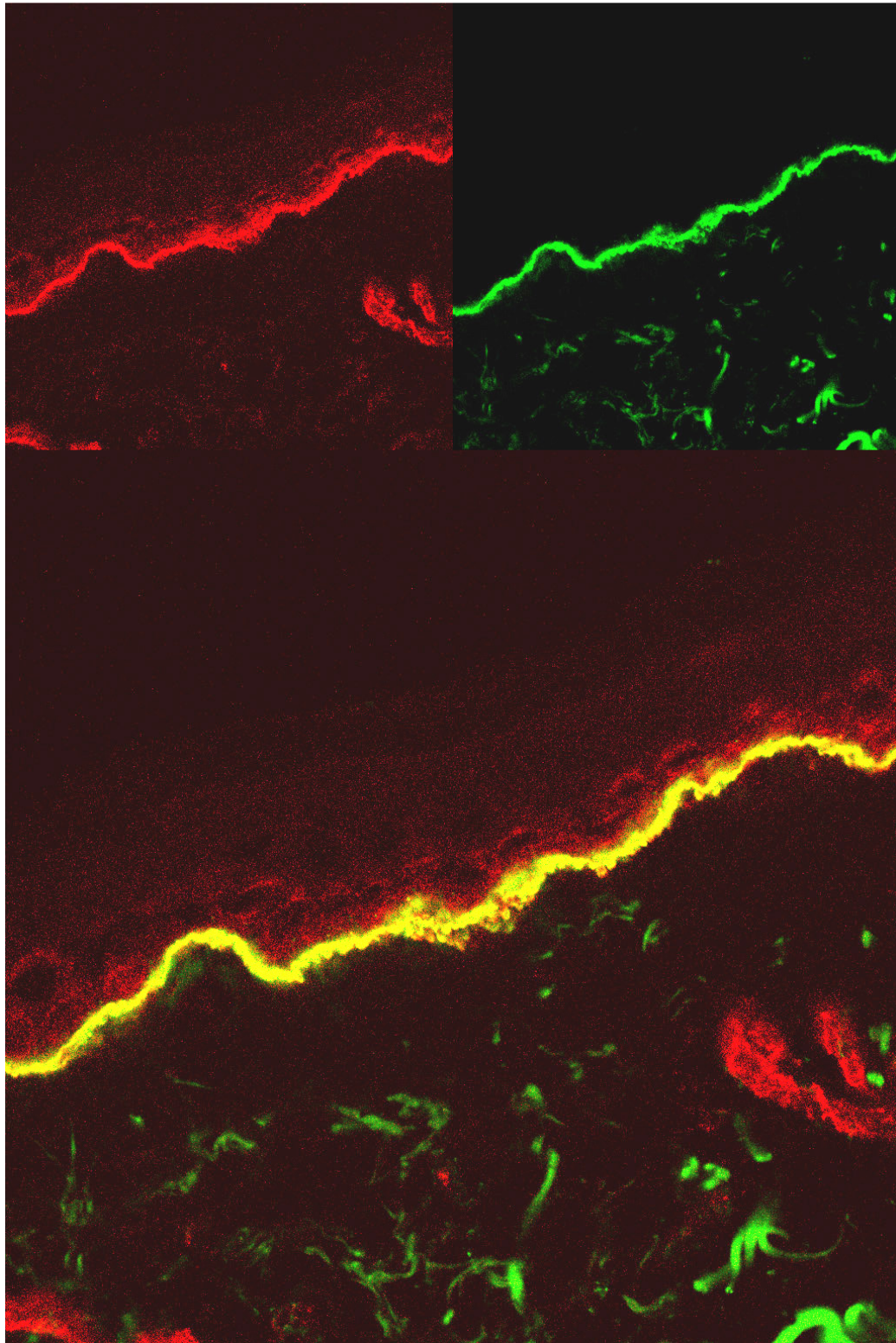


Figura 33:

Imagen correspondiente al mismo caso de la figura 33, en el que se observa que el patrón de colocación de β 4-integrina con IgG es similar al obtenido con C3, por lo que ambas tinciones tienen el mismo valor diagnóstico.

4.2.3. Patrones de marcaje de colágeno en el penfigoide ampoloso

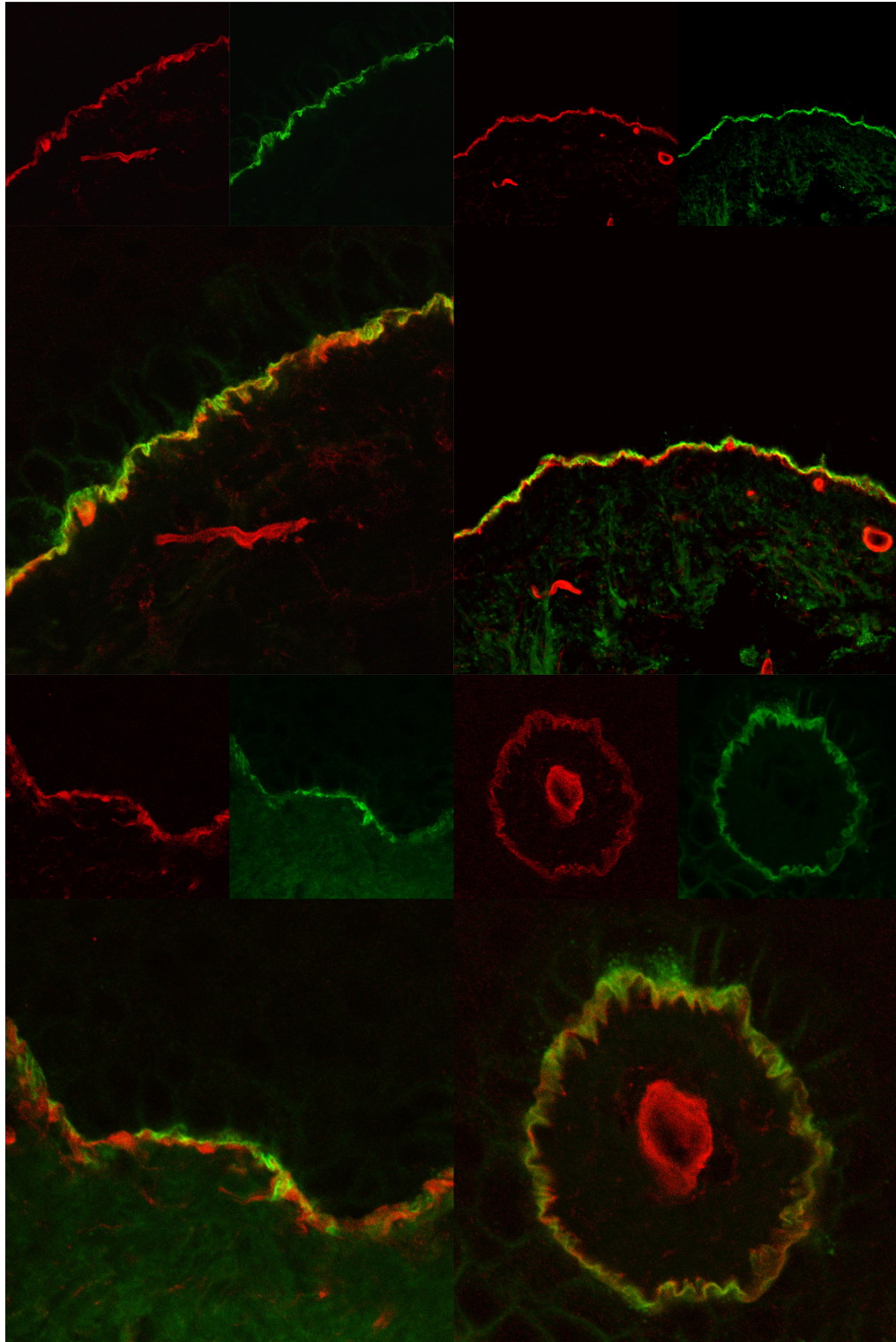


Figura 34:
Patrones de separación del colágeno IV (rojo) de los depósitos autoinmunes (verde) en cuatro casos diferentes de penfigoide ampoloso

En la **figura 34** se muestran varios casos de análisis de IgG o C3 frente a colágeno IV. La banda roja correspondiente al colágeno IV se separa con nitidez de la banda verde correspondiente a los depósitos autoinmunes (IgG o C3). La **figura 35** muestra como los resultados obtenidos para el estudio de IgG y C3 frente a colágeno IV son superponibles.

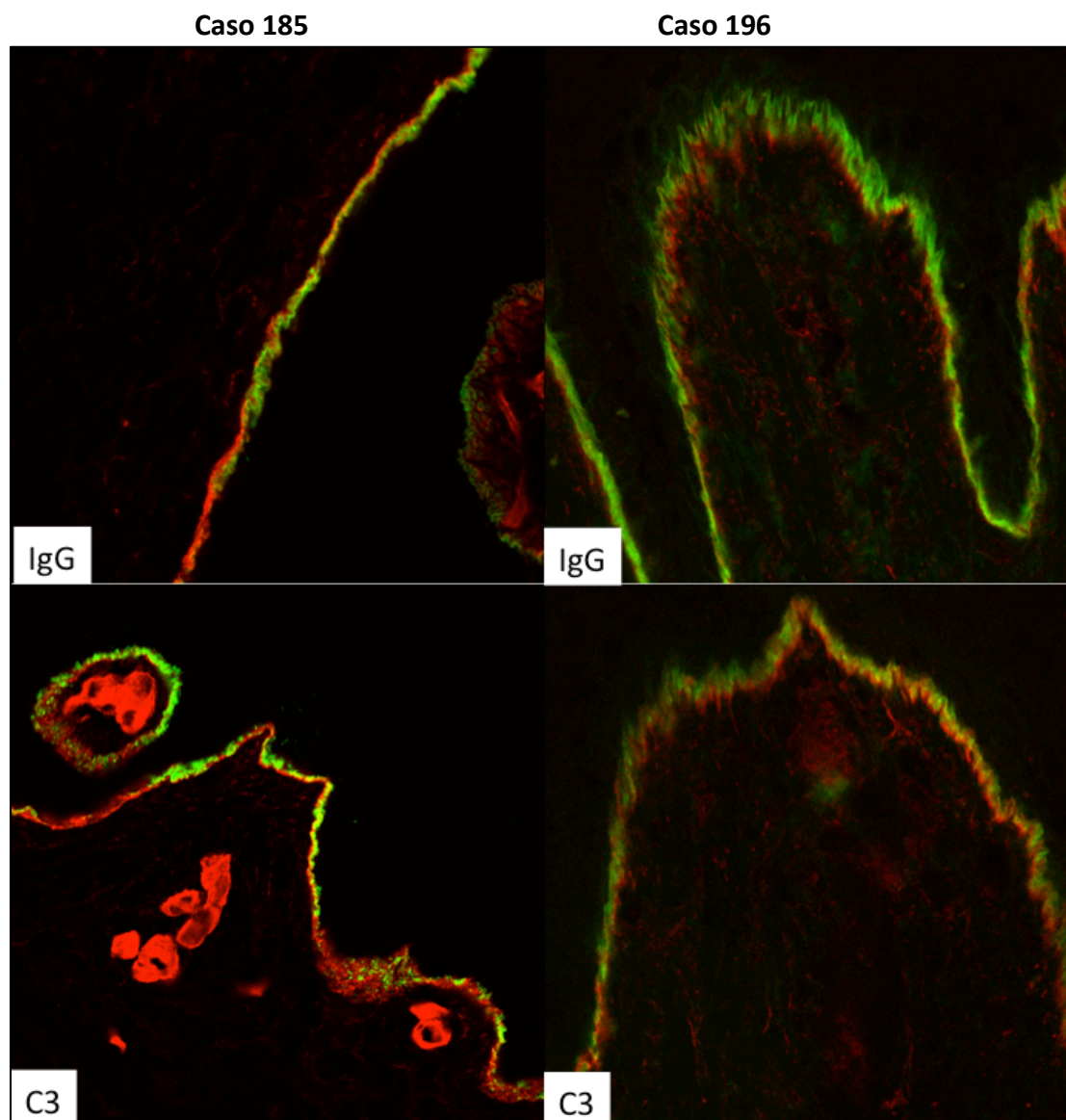


Figura 35:
Se muestran dos casos en los que se realizaron tanto las tinciones de IgG/colágeno IV como las de C3/colágeno IV. Se observa que los resultados son superponibles.

Solo se obtuvo colocalización de los depósitos autoinmunes con el colágeno IV en dos casos de penfigoide ampoloso. Se muestra un ejemplo en la **figura 36**.

La colocalización con colágeno IV y la separación de β 4-integrina hace suponer que el antígeno diana no es BP180.

En estos dos casos, el estudio de piel separada mediante CINA 1M localizó los depósitos autoinmunes en el lado dérmico de la hendidura. Además, la inmunohistoquímica para colágeno IV en parafina mostró una separación superior al colágeno, lo que descartó EAA.

Analizados en su globalidad, junto con el resto de pruebas realizadas, podrían tratarse de formas atípicas de penfigoide, probablemente, de penfigoide anti-p200.

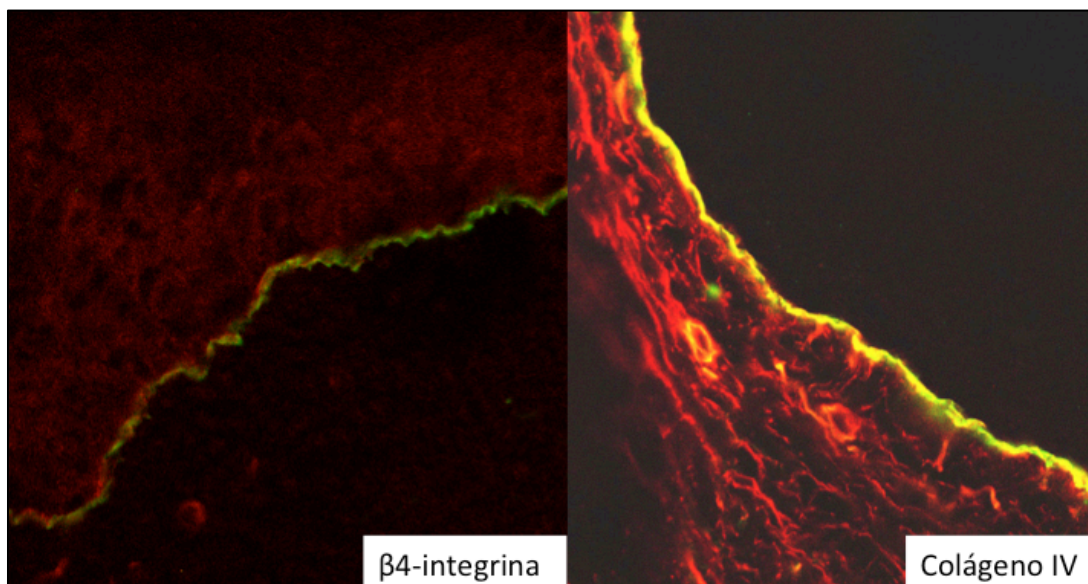


Figura 36:

Imágenes obtenidas en un caso de penfigoide ampoloso cuyo estudio de piel separada en CINA 1M marcaba en el suelo. Al contrario que en los penfigoides ampollosos típicos, se observa una separación de la β 4-integrina y una colocalización con el colágeno IV

4.2.4. Patrones de marcaje de laminina en el penfigoide ampuloso

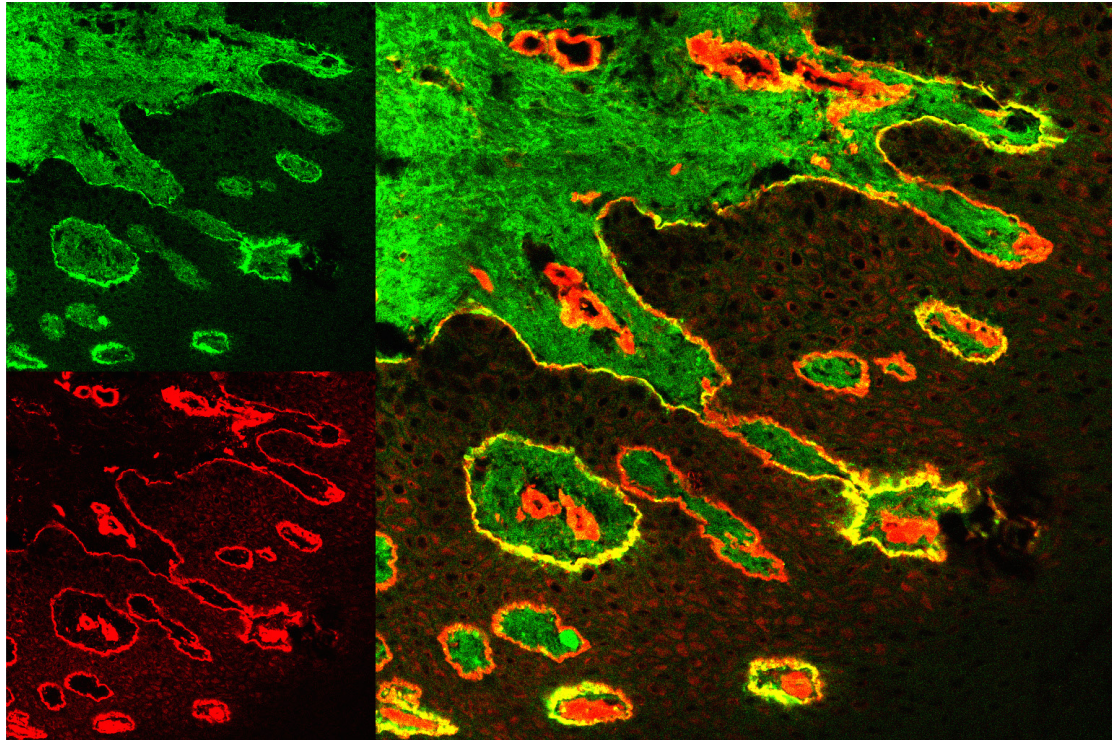


Figura 37:

Verde: tinción para IgG. Rojo: tinción para laminina. Derecha: suma de ambas imágenes.

La tinción empleada para laminina (**figura 37**) marca bien la lámina lúcida en todos los casos. Sin embargo, el patrón moteado obtenido en el penfigoide ampuloso puede variar en distintos casos y es más difícil de interpretar.

Por tanto, las proteínas más aconsejables para el estudio de los casos de penfigoide ampuloso son la $\beta 4$ -integrina y el colágeno IV. Los resultados frente a IgG y C3 son superponibles, por lo que en lugar de realizar 6 dobles tinciones, en caso de necesidad, se pueden obtener resultados diagnósticos con dos dobles tinciones.

4.2.5. Resultados globales del análisis por microscopía confocal de la serie de penfigoide ampolloso

Se realizó microscopía confocal en 22 casos previamente diagnosticados de penfigoide ampolloso por las técnicas convencionales. Por norma general, en los casos en los que no había existido positividad para IgG en la IFD convencional no se realizó tinción para IgG en la microscopía confocal. En dos casos no se realizó tinción para C3, uno por tratarse del caso del estudio piloto y otro por no presentar positividad para C3 en la IFD.

En todos los casos se consiguió el doble objetivo de detectar los depósitos autoinmunes y localizarlos. En 20 de los 22 casos se obtuvo un patrón típico de penfigoide ampolloso: colocalización con β 4-integrina, patrón moteado con la laminina y separación clara de la banda de depósitos autoinmunes de la banda de colágeno IV. En dos casos se obtuvieron resultados diferentes. En el caso 200 se objetivó separación de β 4-integrina y laminina y colocalización con colágeno IV. En el caso 214 se observó colocalización con las tres proteínas, tanto con IgG como con C3. Estos dos casos marcaban en el lado dérmico de la piel separada con NaCl 1M, lo que confirmaba que no eran penfigoides ampollosos típicos. Se realizó una tinción inmunohistoquímica para colágeno IV en parafina en la que se observó que la ampolla se formaba por encima del colágeno IV, lo que descartaba EAA. El diagnóstico más probable de estos dos casos es de penfigoide anti-p200.

Caso	Integrina IgG	Laminina IgG	Colágeno IgG	Integrina C3	Laminina C3	Colágeno C3
151	colocaliza	moteado	separado			
157				colocaliza	moteado	separado
161				colocaliza	moteado	dudoso
163				colocaliza	moteado	separado
173				colocaliza	moteado	dudoso
176				colocaliza	moteado	separado
178				colocaliza	moteado	separado
179				colocaliza	moteado	separado
180	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
181				colocaliza	moteado	separado
185	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
187	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
189	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
191	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
196	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
197	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
200	separado	separado	colocaliza			
204				colocaliza	moteado	separado
208				colocaliza	moteado	separado
209	dudoso		separado	colocaliza	moteado	dudoso
213	colocaliza	moteado	separado	colocaliza	moteado	separado
214	colocaliza	colocaliza	colocaliza	colocaliza	colocaliza	colocaliza

Tabla 4:

Hallazgos de la microscopía confocal en la serie de penfigoide ampuloso

4.3. Estudio de una serie de dermatosis ampollosa IgA lineal

De los 7 casos de dermatosis ampollosa IgA lineal (DAIL) se pudo realizar microscopia confocal en 5 de ellos. En 2 de los casos analizados (uno de ellos, el caso piloto), se situaron los depósitos en la parte alta de la lámina lúcida. En tres de los casos, los depósitos colocalizaron con el colágeno IV de la lámina densa. Esto confirmó de la DAIL es una enfermedad inmunológicamente heterogénea en la que se han descrito antígenos relacionados con proteínas localizadas en niveles más superficiales y más profundos. En la figura 36 se muestra un caso de DAIL con colocalización en las capas profundas.

Caso	Integrina	Laminina	Colágeno
157	Colocalización parcial	Colocalización parcial	Separación
169	Colocalización parcial	Colocalización parcial	Separación
177	Separación	Colocalización parcial	Colocalización
192	Separación	Colocalización parcial	Colocalización
198	Separación	Colocalización parcial	Colocalización

Tabla 5:

Hallazgos de microscopía confocal en la serie de dermatosis ampollosa IgA lineal

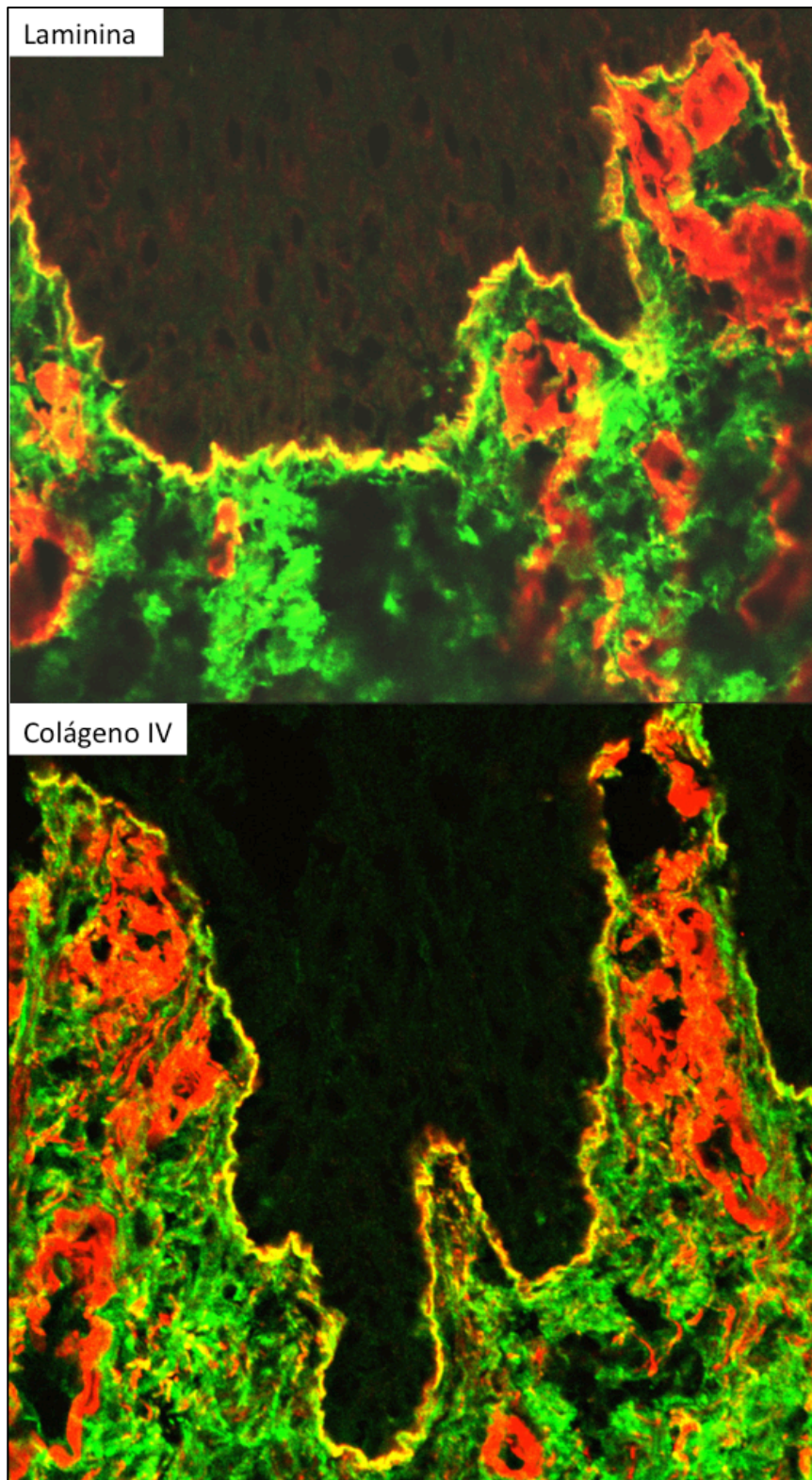


Figura 38:
Imagen del caso 177 de dermatosis ampollosa IgA lineal con un patrón de depósito profundo

4.4. Otras posibilidades de la microscopía confocal

El software acoplado al microscopio confocal brinda enormes posibilidades para el análisis gráfico como se puede observar en las **figuras 39 a 41**. En casos dudosos el software confecciona diferentes tipos de gráficos que contribuyen a solucionar casos problema. Finalmente, hay que destacar las espectaculares imágenes obtenidas con determinados cortes, que contribuyen a nuestro conocimiento de las estructuras subcelulares como se puede observar en la **figura 42**.

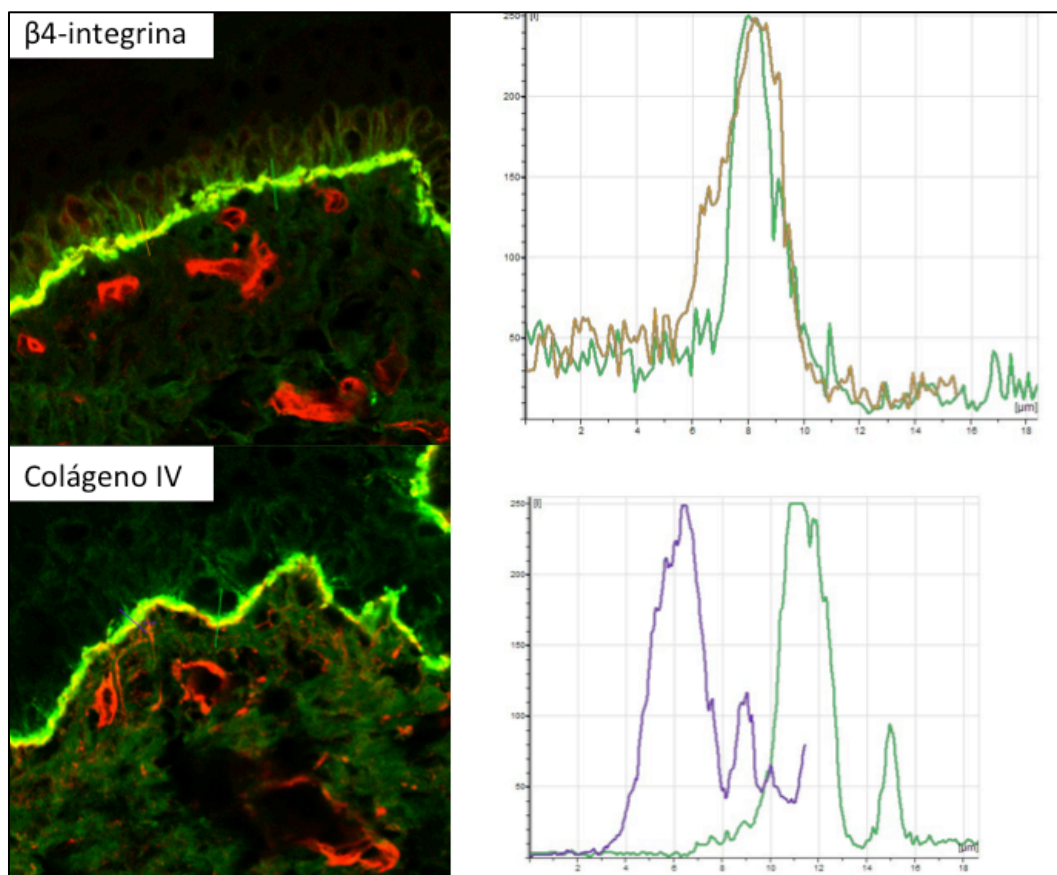


Figura 39:

Análisis gráfico mediante el software del microscopio confocal. En el penfigoide ampolloso se ve una coincidencia del pico de los depósitos de β 4-integrina y C3. En cambio, se ven dos picos separados que corresponden a los depósitos de colágeno IV y C3

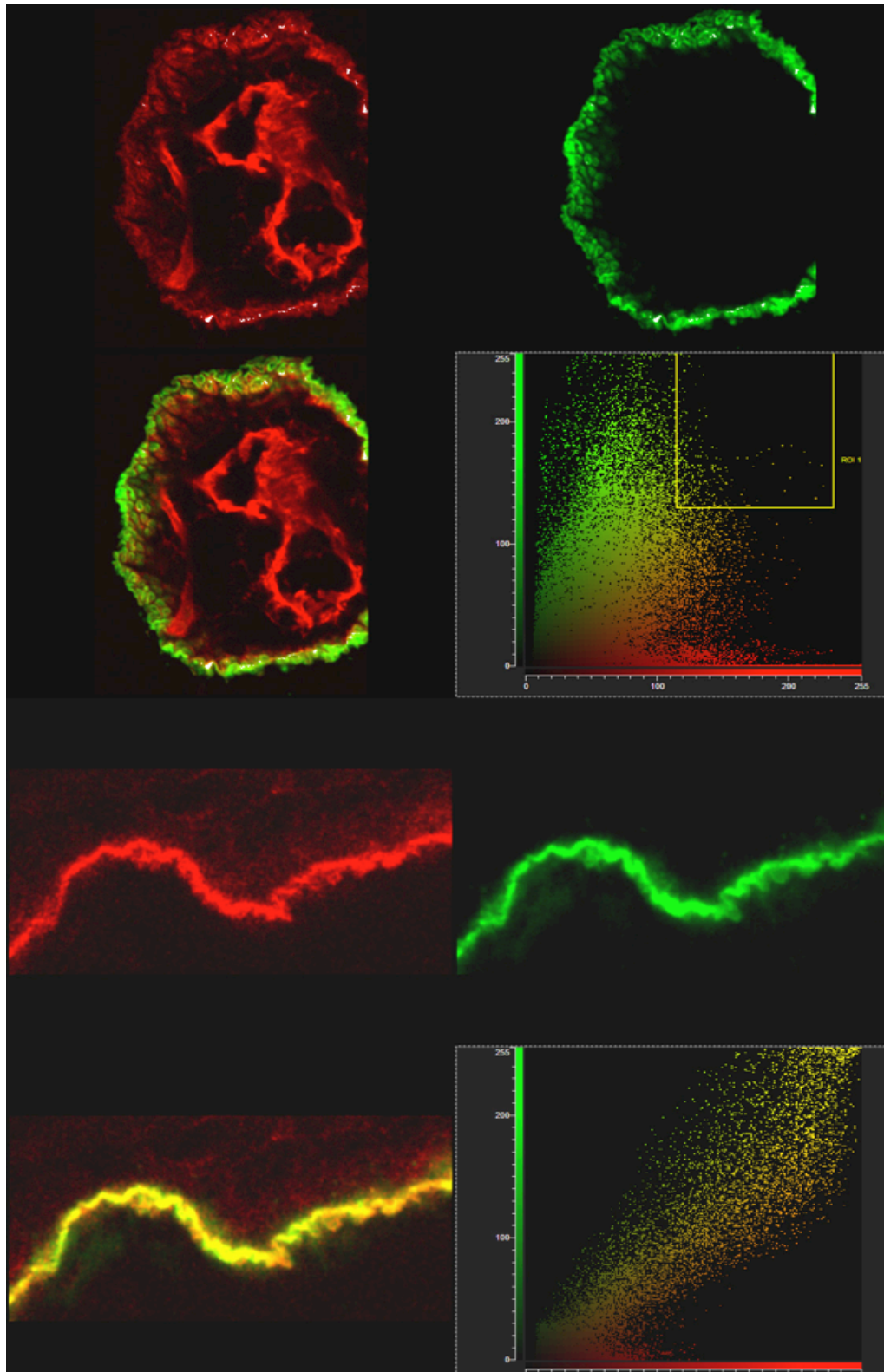


Figura 40:

Gráficos de puntos elaborados por el software del microscopio confocal. En el caso superior, colágeno IV no colocaliza con C3, por lo que hay una ausencia de puntos en la esquina superior derecha del gráfico de puntos. En el caso inferior, β 4-integrina colocaliza con C3, por lo que la distribución de los puntos sigue una recta y hay una densidad alta de puntos en la esquina superior derecha

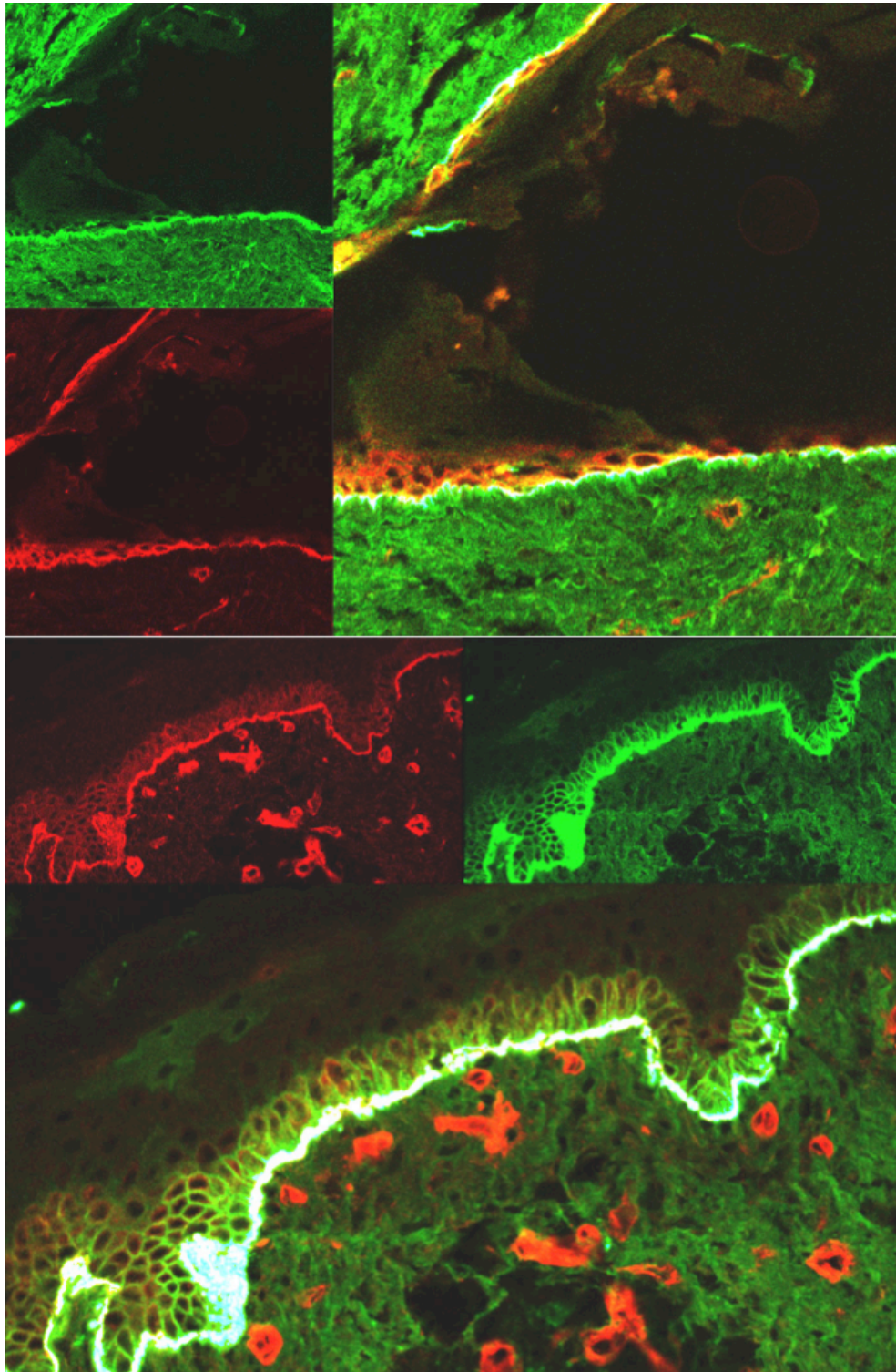


Figura 41:

Procesamiento de imagen denominado *Masked Overlay* por el cual el software marca con un color diferente todas las áreas de colocalización. En estos casos, en lugar de observarse una banda amarilla de colocalización de $\beta 4$ -integrina con IgG se ha elaborado una imagen con una banda brillante blanco-azulada

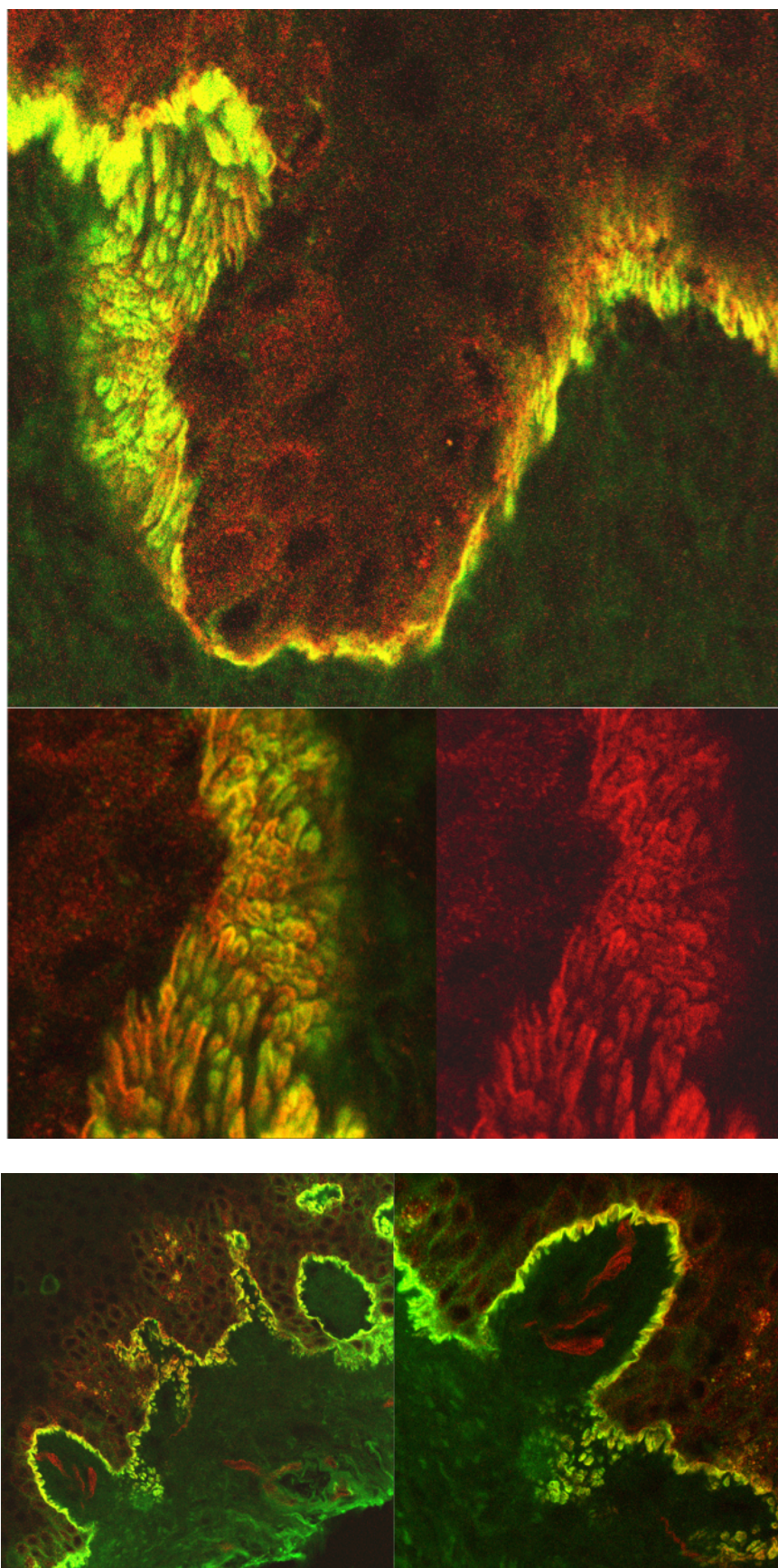


Figura 42:
Imágenes de gran definición de la membrana basal obtenidas mediante CLSM

Discusión

5. DISCUSIÓN

Antecedentes

Nuestro trabajo pretendía aplicar la microscopía confocal al diagnóstico rutinario de enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes (EASA), el grupo más frecuente en nuestro medio y de mayor complejidad diagnóstica..

Previamente al desarrollo del trabajo, el diagnóstico de EASA se realizaba mediante las técnicas de IFD, IFD en piel separada (Anatomía Patológica) e IFI (Inmunología). En este proyecto pretendíamos evaluar las posibilidades reales de la aplicación de microscopía confocal al diagnóstico rutinario de las EASA.

Diagrama de flujo del estudio

Durante un período de 3 años, se recogieron biopsias de 44 pacientes con sospecha de enfermedad ampollosa subepidérmica autoinmune (EASA). Consideramos que el tamaño de la muestra fue acorde a la incidencia de estas enfermedades y que la muestra obtenida fue representativa

En todos los pacientes se realizó una exploración general, una exploración cutánea, un estudio histopatológico convencional, un estudio de inmunofluorescencia convencional, un estudio de inmunofluorescencia en piel separada y un estudio inmunológico del suero. Aunque pudiera parecer que una cuarta biopsia cutánea es una sobrecarga para un paciente que ya está siendo sometido a tres

biopsias, en la realidad se trata de biopsias muy pequeñas que se toman juntas, por lo que apenas aumenta el tamaño del defecto o el número de puntos de sutura por realizar una biopsia más.

De los 44 pacientes, en 36 se confirmó la presencia de una enfermedad ampollosa autoinmune y en 8 se descartó enfermedad ampollosa autoinmune. En este grupo de 8 enfermos con trastornos no autoinmunes se diagnosticó a 5 pacientes de eccema y al resto de porfiria cutánea tarda, foliculitis y prurigo. Esto entra dentro de lo esperable, ya que múltiples enfermedades cutáneas pueden cursar con lesiones vesiculoampollosas y por tanto simular una enfermedad ampollosa autoinmune. Tampoco sorprende que se puedan confundir clínicamente una enfermedad ampollosa subepidérmica y otra intraepidérmica.

Finalmente, los 34 pacientes con enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes (EASA) fueron diagnosticados en 25 casos de penfigoide ampolloso, en 7 casos de dermatosis ampollosa IgA lineal (DAIL), en 1 caso de lupus eritematoso ampolloso y en otro caso de epidermólisis ampollosa adquirida. La distribución de las diferentes EASA en nuestra serie refleja bien la incidencia esperable de estas enfermedades. En nuestro medio la más frecuente es con gran diferencia el penfigoide ampolloso, seguido de la DAIL.

Estudio piloto

Se encontró que cada una de las enfermedades analizadas tenía un patrón totalmente característico en la microscopía confocal. Se encontraron hallazgos específicos en cada una de las distintas enfermedades analizadas (PA, DAIL, LEA y EAA)

Como conclusión del estudio piloto, se confirmó la primera hipótesis de nuestro estudio: la técnica FOAM (*fluorescent overlay antigen mapping*) realizada mediante microscopía confocal es sensible para detectar los depósitos autoinmunes en las enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes.

Estudio de la serie de penfigoide ampolloso

Como continuación del estudio, se procedió a estudiar en condiciones de práctica clínica habitual dos muestras de pacientes de penfigoide ampolloso y dermatosis ampollosa IgA lineal.

En la serie de penfigoide ampolloso, compuesta por 25 pacientes, la inmunofluorescencia directa fue positiva para C3 en 23 de 25 casos (92%). Fue positiva para IgG en 17 de 25 casos (68%). Lógicamente, al tratarse de penfigoide ampolloso, la IFD IgA fue negativa en todos los casos. La técnica de inmunofluorescencia directa en piel separada solo obtuvo resultados diagnósticos en 13 de 25 casos (52%). El mayor porcentaje de positividad de C3 que de IgG es un dato frecuentemente reportado en la literatura.

La microscopía confocal se pudo realizar en 22 de los 25 pacientes y consiguió el doble objetivo de detectar los depósitos autoinmunes y localizar su nivel en la membrana basal en el 100% de los casos.

Por tanto, la microscopía confocal tiene una sensibilidad superior a la combinación de IFD convencional e IFD en piel separada con CINA.

En microscopía confocal se observaron resultados muy consistentes y reproducibles en las tinciones con β 4-integrina y colágeno. La tinción para laminina tuvo más dificultades de interpretación y no parece tan rentable para un análisis inicial.

Se pudo comprobar que los patrones de colocalización con C3 y con IgG eran idénticos, por lo que realizar solo una de las dos tinciones ahorraría tiempo y reactivos.

En la serie de penfigoide ampuloso destacaron dos casos con depósitos en la parte profunda de la lámina lúcida, como ya se ha discutido, se tratarían probablemente de penfigoides anti-p200.

Estudio de la serie de IgA lineal

De los 7 casos de dermatosis ampulosa IgA lineal (DAIL) se pudo realizar microscopia confocal en 5 de ellos. En 2 de los casos analizados (uno de ellos, el caso piloto), se situaron los depósitos en la parte alta de la lámina lúcida. En tres de los casos, los depósitos colocalizaron con el colágeno IV de la lámina densa. Esto confirmó de la DAIL es una enfermedad inmunológicamente heterogénea en la que se han descrito antígenos relacionados con proteínas localizadas en niveles más superficiales y más profundos.

Dado que la DAIL tiene una clínica típica y que la banda de IgA se diagnostica con una simple inmunofluorescencia directa,

consideramos que la microscopía confocal no jugaría un papel importante en el diagnóstico clínico de esta enfermedad.

Otras posibilidades de la microscopía confocal

Ha sido de gran interés explorar las posibilidades del software tanto desde el punto de vista gráfico como cuantitativo.

Unidad de Microscopía Confocal hospitalaria

Se confirmó la hipótesis de que una Unidad de Confocal hospitalaria tiene capacidad y flexibilidad suficientes para compaginar la función investigadora con la asistencial, bien rutinaria, bien en casos específicos en los que el diagnóstico convencional sea complejo, ya que durante 3 años consecutivos la Unidad ha estado al servicio de las necesidades diagnósticas de la Unidad de Enfermedades Ampollosas.

Aportaciones del trabajo

Nuestro trabajo refuerza el valor diagnóstico de la inmunofluorescencia directa, que nunca debe dejar de realizarse en las enfermedades ampollosas autoinmunes. Sárdy et al demostraron¹²⁵ que las técnicas de inmunofluorescencia directa son más sensibles que el ELISA. Otro grupo demostró que ante una recidiva en un penfigoide ampolloso, la inmunofluorescencia directa también tiene un mayor porcentaje de positividad¹²⁶.

Con respecto a las diferencias que aporta la inmunofluorescencia directa realizada en el microscopio confocal (FOAM) con respecto a la convencional, hay ventajas y desventajas. Las técnicas de

diagnóstico basadas en inmunofluorescencia convencional dependen de la experiencia y entrenamiento del observador a la hora de interpretar la distribución de los depósitos autoinmunes. Por el contrario, el FOAM consiste básicamente en un análisis de colocalización entre los depósitos autoinmunes y los antígenos diana de la unión dermoepidérmica específicos para cada subtipo de EASA. Este análisis solo se puede realizar mediante un microscopio confocal, ya que es el único tipo dispositivo que genera imágenes sin solapamiento y susceptibles de análisis informático de colocalización, eliminando los elementos subjetivos del diagnóstico. El diagnóstico mediante microscopía confocal ofrece mayor sensibilidad y especificidad al ser un método objetivo y cuantitativo, sustituye la valoración cualitativa dependiente de la experiencia del facultativo; ofrece mayor rapidez, sencillez y menor coste al sustituir técnicas complejas alternativas, así como información adicional de utilidad imposible de conseguir con los modelos convencionales de microscopios de fluorescencia.

- Ventajas

- Mayor capacidad diagnóstica que la inmunofluorescencia directa aislada
- Igual o mayor capacidad diagnóstica que la inmunofluorescencia directa de piel separada

- No se precisa transportar la biopsia en medio especial
- Inconvenientes
 - Doble marcaje mayor complejidad
 - Adquisición de imagen por técnico especializado en microscopía confocal

En los últimos años han surgido aparatos para la práctica de microscopía confocal *in vivo*. Se ha publicado un artículo que aplica este dispositivo al diagnóstico del penfigoide ampolloso¹²⁷, sin embargo, a día de hoy, la microscopía confocal *ex vivo* sigue aportando más información.

Limitaciones del estudio

Se han desvelado datos muy importantes sobre la patogenia y epidemiología del penfigoide ampolloso (PA) en los últimos años¹²⁸⁻¹³¹. Por el diseño del estudio, no se realizó el estudio de correlación clínico-inmunológica que podría haber ayudado a la comprensión de casos clínicamente atípicos¹³². Tampoco se registraron los casos asociados a neoplasias¹³³ ni a enfermedades neurológicas degenerativas¹³³⁻¹³⁵.

Nuestro estudio se centró en el estudio de los depósitos de IgG¹³⁶⁻¹³⁹ y complemento¹⁴⁰, de cuya participación patogénica en el PA no cabe duda. Se ha demostrado que la simple unión de IgG anti-BP180 a su diana induce la internalización de esta proteína¹³⁶ y la aparición de ampollas¹³⁶. Incluso se ha demostrado eficacia de una

terapia biológica basada en anticuerpos contra la inmunoglobulina patógena¹³⁸.

Sin embargo, el paradigma actual del penfigoide ampuloso ha devuelto al papel protagonista a la IgE, una vieja conocida. Ya en 1974, Provost y colaboradores¹⁴¹ demostraron el depósito lineal de IgE en la membrana basal en el PA. En los últimos años, el papel central de la IgE ha sido objeto de excelentes revisiones¹⁴¹⁻¹⁴³ que han dado lugar a nuevas conjeturas¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Actualmente está en estudio la sensibilidad del ELISA frente a IgE¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ y la interacción de esta IgE con los mastocitos¹⁵⁰⁻¹⁵¹ y eosinófilos¹⁵²⁻¹⁵⁴. Desde el punto de vista terapéutico, este papel central de la IgE ha motivado ensayos terapéuticos con el fármaco biológico omalizumab, que bloquea la IgE, con resultados prometedores¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Con respecto a la inmunidad celular, también hay un lugar destacado de las células T¹⁵⁸⁻¹⁵⁹. Las interleuquinas IL-21¹⁶⁰ e IL-17¹⁶¹⁻¹⁶³ podrían jugar un papel importante. También se ha descubierto la interacción de los macrófagos M2 con las vías Th2¹⁶⁴ y posteriormente con la producción de IgE.

Por último, la elastasa de los neutrófilos¹⁶⁵ es responsable de la degradación de la matriz extracelular.

En conclusión, nuestro estudio se ha centrado en el diagnóstico, pero sin duda el microscopio confocal podría tratarse de una herramienta extraordinariamente útil para el estudio de la compleja patogenia de esta enfermedad.

Referencias

1. Megahed M. Histopathology of blistering diseases. Berlín-Heidelberg: Springer-Verlag, 2004.
2. España A. Estructura de la membrana basal. En: Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. Enfermedades ampollasas. Madrid: Aula Médica, 2004; p.17-21.
3. Chan FjL, Inoue S. Lamina lucida of basement membrane: an artefact. *Microsc Res Tech.* 1994;28:48-59.
4. Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Diaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognized a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol.* 1993; 151:5724-5750.
5. Zillikens D. BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes. *Keio J Med.* 2002;51:21-8.
6. Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Black MM. Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30:682-7.
7. Hamill KJ, Hopkinson SB, Jonkman MF, Jones JC. Type XVII collagen regulates lamellipod stability, cell motility, and signaling to Rac1 by targeting bullous pemphigoid antigen 1e to alpha6-beta4-integrin. *J Biol Chem.* 2011;286:26768-80.
8. Balding SD, Diaz LA, Giudice GJ. A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like homotrimeric complex. *Biochemistry.* 1997;36:8821-8830.
9. Herrero-Gonzalez JE, Brauns O, Egner R, Ronspeck W, Mascaró JM Jr, Jonkman MF, Zillikens D, Sitaru C. Immunoabsorption against two distinct epitopes on human type XVII collagen abolishes dermal-epidermal separation induced in vitro by autoantibodies from pemphigoid gestationis patients. *Eur J Immunol.* 2006;36:1039-48.
10. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ . A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest.* 1993;92:2480-2488.
11. Yancey KB. Itch, eosinophils, and autoimmunity: a novel murine model of bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2015;135:1213-5.
12. Hurskainen T, Kokkonen N, Sormunen R, Jackow J, Löffek S, Soininen R, Franzke CW, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K. Deletion of the major bullous pemphigoid epitope region of collagen XVII induces blistering, autoimmunization, and itching in mice. *J Invest Dermatol.* 2015;135:1303-10.
13. Groves RW, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Markus HS, Lovell PA, Ozoemena L, Lai-Cheong JE, Gawler J, Owaribe K, Hashimoto T, Mellerio JE, Mee JB, McGrath JA. A homozygous nonsense mutation within the dystonin gene coding for the coiled-coil domain of the epithelial isoform of BPAG1 underlies a new subtype of autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol.* 2010;130:1551-7.

14. Fujiwara S, Kohno K, Iwamatsu A et al. Identification of a 450-kDa human epidermal autoantigen as a new member of the plectin family. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1125-30.
15. Fujiwara S, Shinkai H, Takayasu S, et al. A case of sub-epidermal blister disease associated with autoantibody against 450 kD protein. *J Dermatol.* 1992;19:610-3.
16. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi A, et al. A vesicular bullous pemphigoid with an autoantibody against plectin. *Br J Dermatol.* 2000;142:813-5.
17. Laffitte E, Favre B, Fontao L et al. Plectin, an unusual target antigen in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2001; 144:136-8.
18. McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJ, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM, Uitto J. Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* 1996;10:1724-35.
19. Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB. Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest.* 1992;90:1628-33.
20. Chan LS, Majmudar AA, Tran HH, Meier F, Schaumburg-Lever G, Chen M, Anhalt G, Woodley DT, Marinkovich MP. Laminin-6 and laminin 5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 848-53.
21. Leverkus M, Schmidt E, Lazarova Z, Brocker EB, Yancey KB, Zillikens D. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid: an underdiagnosed entity within the spectrum of scarring autoimmune subepidermal bullous diseases? *Arch Dermatol.* 1999;135:1091-8.
22. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB. Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol.* 1995;105:543-8.
23. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1986;103:1577-1586.
24. Uitto J, Chung-Honet LC, Christiano AM. Molecular biology and pathology of type VII collagen. *Exp Dermatol.* 1992;1:2-11.
25. Christiano AM, Rosenbaum LM, Chung-Honet LC, Parente MG, Woodley DT, Pan TC, Zhang RZ, Chu ML, Burgeson RE, Uitto J. The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal and chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin and the A domains of von Willebrand factor. *Hum Mol Genet.* 1992;1:475-81.
26. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, Uitto J. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest.* 1993;92:1831-9.

27. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med*. 1984; 310: 1007-13.
28. Gammon WR, Woodley DT, Dole KC, Briggaman RA. Evidence that anti-basement membrane zone antibodies in bullous eruptions of systemic lupus erythematosus recognize epidermolysis bullosa acquisita antigen. *J Invest Dermatol*. 1985;84:472-476.
29. Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. *Diseases of autoimmunity to type VII collagen*. *Dermatol Clin*. 1993; 11: 535-47.
30. Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. *Enfermedades ampollosas*. Madrid: Aula Médica, 2004.
31. Eming R, Hertl M. Autoimmune bullous disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:144-9
32. Mutasim DF, Pelc NJ, Supapannachart N. Established methods in the investigation of bullous diseases. *Dermatol Clin*. 1993;11:399-418.
33. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:803-22.
34. Morrison LH. Direct immunofluorescence microscopy in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clin Dermatol*. 2001;19:607-613.
35. Alonso Llamazares J. Inmunofluorescencia en enfermedades ampollosas autoinmunes En: Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. *Enfermedades ampollosas*. Madrid: Aula Médica, 2004; p.22-32
36. De Jong MC, van der Meer JB, de Nijs JA, van der Putte SC. Concomitant immunohistochemical characteristics of pemphigoid and dermatitis herpetiformis in a patient with atypical bullous dermatosis. *Acta Derm Venereol*. 1983;63:476-82.
37. Vodegel RM, Kiss M, Cjm De Jong M, Pas HH, Altmayer A, Molnar K, Husz S, Van Der Meer JB, Jonkman MF. The use of skin substrates deficient in basement membrane molecules for the diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disease. *Eur J Dermatol*. 1998;8:83-5.
38. Takahashi H, Anzai H, Suzuki Y, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T. Parallel fluctuation of anti-desmoglein 3 and anti-BP180 autoantibody titres in a patient with bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*. 2004;29:608-11
39. Hashimoto T, Watanabe K, Ishiko A et al. A case of bullous pemphigoid with antidesmoplakin autoantibodies. *Br J Dermatol*. 1994; 131: 694-9.
40. Okura M, Tatsuno Y, Sato M et al. Vesicular pemphigoid with antidesmoplakin autoantibodies. *Br J Dermatol*. 1997;136: 794-6.
41. Takahashi H, Wada T, Matsuo S et al. A case of bullous pemphigoid with antibodies against intercellular 130 kd antigen. *J Dermatol*. 1995; 22: 576-81.
42. Korman NJ, Stanley JR, Woodley DT. Coexistence of pemphigus foliaceus and bullous pemphigoid. Demonstration of autoantibodies that bind to both the

pemphigus foliaceus antigen complex and the bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol.* 1991; 127: 387–90.

43. Ishiko A, Hashimoto T, Shimizu H et al. Combined features of pemphigus foliaceus and bullous pemphigoid: immunoblot and immunoelectron microscopic studies. *Arch Dermatol.* 1995; 131: 732–4.

44. Matsubara K, Kanauchi H, Tanaka T et al. Coexistence of pemphigus and bullous pemphigoid. *J Dermatol.* 1995; 22:68–71.

45. Ninomiya J, Nakabayashi A, Sei Y et al. Bullous pemphigoid complicated with pemphigus vulgaris? *Dermatology.* 1994; 189: 117–9.

46. Hashimoto T, Tsuruta D, Dainichi T, Hamada T, Furumura M, Ishii N. Demonstration of epitope spreading in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2175-7.

47. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour JP, Sera F, Bruckner-Tuderman L, Zambruno G, Borradori L, Hertl M. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2271-80.

48. Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T et al. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol.* 1998; 110: 103–9.

49. Sladden C, Kirchof MG, Crawford RI. Biopsy location for direct immunofluorescence in patients with suspected bullous pemphigoid impacts probability of a positive test result. *J Cutan Med Surg.* 2014;18:392-6.

50. Bean SF. Proper biopsy technique for immunofluorescence tests on skin. *J Dermatol Surg.* 1976;2:148-50.

51. Weigand DA. Effect of anatomic region on immunofluorescence diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 1985;12(2 Pt 1):274-8.

52. Nisengard RJ, Blaszczyk M, Chorzelski T, Beutner : Immunofluorescence of biopsy specimens: comparison of methods of transportation. *Arch Dermatol.* 1978;114:1329-1332

53. Vodegel RM, de Jong MC, Meijer HJ, Weytingh MB, Pas HH, Jonkman MF. Enhanced diagnostic immunofluorescence using biopsies transported in saline. *BMC Dermatol.* 2004;4:10.

54. Skeete MV, Black MM: The evaluation of a special liquid fixative for direct immunofluorescence. *Clin Exp Dermatol.* 1977, 2:49-56.

55. Vaughan Jones SA, Salas J, McGrath JA, Palmer I, Bhogal GS, Black MM. A retrospective analysis of tissue-fixed immunoreactants from skin biopsies maintained in Michel's medium. *Dermatology.* 1994;189 Suppl 1:131-2.

56. Vaughan Jones SA, Palmer I, Bhogal BS, Eady RA, Black MM. The use of Michel's transport medium for immunofluorescence and immunoelectron microscopy in autoimmune bullous diseases. *J Cutan Pathol.* 1995;22:365-70.

57. Woollons A, Holmes GJ, Gratian MJ, Bhogal BS, Black MM. Michel's medium: a potential alternative to cryoprotection for tissue transport in the investigation of genetic skin disease. *Clin Exp Dermatol*. 1999;24:487-9.
58. Zeina B, Allen J, Wojnarowska F, Dean D, Al-assad S, Daoud S, Duhra P. Effectiveness of honey as a transport and storage medium for skin: the evidence from direct immunofluorescence. *J EADV*. 2005; 19 (Suppl. 2):302
59. Vodegel RM, Jonkman MF, Pas HH, de Jong MC. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol*. 2004;151:112-8.
60. Dikicioglu E, Meteoglu I, Okyay P, Culhaci N, Kacar F. IgA con IgG The reliability of long-term storage of direct immunofluorescent staining slides at room temperature. *J Cutan Pathol*. 2003;30:430-6
61. Woodley D, Sauder D, Talley MJ, Silver M, Grotendorst G, Qwarnstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *J Invest Dermatol*. 1983;81:149-53.
62. Gammon WR, Kowalewski C, Chorzelski TP, Kumar V, Briggaman RA, Beutner EH: Direct immunofluorescence studies of sodium chloride-separated skin in the differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol*. 1990;22:664-670.
63. Domloge-Hultsch N, Bisalbutra P, Gammon WR, Yancey KB: Direct immunofluorescence microscopy of 1 mol/L sodium chloride-treated patient skin. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24:946-951.
64. Jenkins RE, Rodenas J, Bhogal BS, Black MM. Optimal conditions of 1 M NaCl splitting technique to demonstrate basement membrane zone antigens in bullous pemphigoid, epidermolysis bullosa acquisita and linear IgA bullous dermatoses. *Dermatology*. 1994;189 Suppl 1:133-4.
65. Prost C, Dubertret L, Fosse M et al. A routine immunoelectron microscopic technique for localizing an autoantibody on epidermal basement membrane. *Br J Dermatol*. 1984; 110: 1-7.
66. Allen J, Shears E, Powell J, Wojnarowska F. Assessment of skin basement membrane zone antibodies in the urine of patients with acquired subepidermal immunobullous diseases. *Br J Dermatol*. 2001;144:540-5.
67. Esmaili N, Mortazavi H, Kamyab-Hesari K, Aghazadeh N, Daneshpazhooh M, Khani S, Chams-Davatchi C. Diagnostic accuracy of BP180 NC16a and BP230-C3 ELISA in serum and saliva of patients with bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40:324-30.
68. Burnham TK. Indirect cutaneous immunofluorescence. II. Clinical significance. *J Clin Pathol*. 1973;26:268-72.
69. Kanitakis J. Indirect immunofluorescence microscopy for the serological diagnosis of autoimmune blistering skin diseases: a review. *Clin Dermatol*. 2001;19:614-21.
70. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO III, Queen LL, Wheeler CE. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies

by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol.*1984; 82: 139-44.

71.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.* 1988;118:31-40.

72. Onodera Y, Shimizu H, Hashimoto T, Ishiko A, Ebihara T, Tanaka M, Nishikawa T. Difference in binding sites of autoantibodies against 230- and 170-kD bullous pemphigoid antigens on salt-split skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102:686-90.

73.Lazarova Z, Yancey KB. Reactivity of autoantibodies from patients with defined subepidermal bullous diseases against 1 mol/L salt-split skin. Specificity, sensitivity, and practical considerations. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35(3 Pt 1):398-403.

74.Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy AL. Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses. *Arch Dermatol.* 1997;133:1102-7.

75.Zillikens D, Ishiko A, Jonkman MF, Chimanovitch I, Shimizu H, Hashimoto T, Brocker EB. Autoantibodies in anti-p200 pemphigoid stain skin lacking laminin 5 and type VII collagen. *Br J Dermatol.* 2000;143:1043

76.Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol.* 1978;31:507-20.

77. Mascaró Galy JM. Otras técnicas diagnósticas en enfermedades ampollas autoinmunes En: Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. *Enfermedades ampollas.* Madrid: Aula Médica, 2004; p.33-39.

78.D'Agosto G, Latini A, Carducci M, Mastroianni A, Vento A, Fei PC. Evaluation of recombinant antigen-based assays for diagnosis of bullous autoimmune diseases. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:762-5.

79.G.J. Giudice, K.C. Wilske, G.J. Anhalt, J.A. Fairley, A.F. Taylor, D.J. Emery, R.G. Hoffmann and L.A. Diaz, Development of ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J. Invest. Dermatol* 1994; 102:878-881.

80.Matsumura K, Amagai M, Nishikawa T, Hashimoto T. The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen, *Arch Dermatol Res.* 1996;288:507-509.

81.Zillikens D, Mascaró JM, Rose PA et al. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1997; 109:679-83.

82.Chimanovitch I, Hamm H, Georgi M, Kroiss M, Stolz W, Aritz C, Brocker EB, Zillikens D. Bullous pemphigoid of childhood: autoantibodies target the same epitopes within the NC16A domain of BP180 as autoantibodies in bullous pemphigoid of adulthood. *Arch Dermatol.* 2000;136:527-32.

83. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16A protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2002; 30: 224–32.
84. Yang B, Wang C, Chen S, Chen X, Lu X, Tian H, Yu M, Zhang D, Shi Z, Zhou G, Zhang F. Evaluation of the combination of BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay and BP230 enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2012;78:722-7.
85. Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiat Z, Barbe C, et al. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch Dermatol.* 2011; 147: 286–291.
86. Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2011; 147: 293–298.
87. 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 immunosorbent assay. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68:395-403.
88. Patsatsi A, Kyriakou A, Pavlitou-Tsiontsi A, Giannakou A, Sotiriadis D. Association of autoantibodies to BP180 with disease activity in Greek patients with bullous pemphigoid. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:854795.
89. Cai SC, Lim YL, Li W, Allen JC, Chua SH, Tan SH, Tang MB. Anti-BP180 NC16A IgG Titres as an Indicator of Disease Activity and Outcome in Asian Patients with Bullous Pemphigoid. *Ann Acad Med Singapore.* 2015;44:119-26.
90. Zhou XP, Liu B, Xu Q, Yang Y, He CX, Zuo YG, Liu YH. 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.* 2015 Aug 24.
91. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2000;136:174-8.
92. Amo Y, Ohkawa T, Tatsuta M, Hamada Y, Fujimura T, Katsuoka K, Hashimoto T. Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2001;26:14-8.
93. 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 protein and monitoring tool for bullous pemphigoid, *J Dermatol Sci.* 2002;30:224-232.
94. Lee JB, Fumimori T, Kurose K, Mori O, Hashimoto T: A case of bullous pemphigoid successfully treated by plasmapheresis: assesment of the change in titers of circulating antibodies by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Dermatol.* 2003;30:326-331.

95. Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol.* 1997; 108:68-72.
96. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Biología molecular de la célula.* Barcelona:Omega, 2004.
97. Pas HH, Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Clin Dermatol.* 2001;19:622-630.
98. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:4350-4354.
99. Bernard P, Aucouturier P, Denis F, Bonnetblanc JM. Immunoblot analysis of IgG subclasses of circulating antibodies in bullous pemphigoid. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; 54: 484-494.
100. Egan CA, Yee C, Zillikens D, Yancey KB. Anti-p200 pemphigoid: diagnosis and treatment of a case presenting as an inflammatory subepidermal blistering disease. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46:786-9.
101. Umemoto N, Demitsu T, Toda S, Noguchi T, Suzuki SI, Kakurai M, Yamada T, Suzuki M, Nakagawa H, Komai A, Hashimoto T. No abstract A case of anti-p200 pemphigoid clinically mimicking inflammatory epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol.* 2003;148:1058-60.
102. Shimanovich I, Hirako Y, Sitaru C, Hashimoto T, Brocker EB, Butt E, Zillikens D. The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1402-8.
103. Cho SB, Kim SC. A Korean case of anti-p200 pemphigoid. *Yonsei Med J.* 2003;44:931-4.
104. Furukawa H, Miura T, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F, Ishii F, Komai R, Hashimoto T. A case of anti-p200 pemphigoid with autoantibodies against both a novel 200-kD dermal antigen and the 290-kD epidermolysis bullosa acquisita antigen. *Dermatology.* 2004;209:145-8.
105. Yasuda H, Tomita Y, Shibaki A, Hashimoto T. Two cases of subepidermal blistering disease with anti-p200 or 180-kD bullous pemphigoid antigen associated with psoriasis. *Dermatology.* 2004;209:149-55.
106. Shimanovich I, Petersen EE, Weyers W, Sitaru C, Zillikens D. Subepidermal blistering disease with autoantibodies to both the p200 autoantigen and the alpha3 chain of laminin 5. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52:S90-2.
107. Yamada T, Suzuki M, Koike Y, Kida K, Murata S, Ishii N, Hashimoto T, Ohtsuki M. A case of epidermolysis bullosa acquisita with autoantibody to anti-p200 pemphigoid antigen and exfoliative esophagitis. *Dermatology.* 2006;212:381-4.
108. España A, Del Olmo J, Marquina M, Sitaru C. Penfigoide de mucosas: anticuerpos IgG e IgA contra el antígeno BP180. *Actas Dermosifiliogr* 2005;96:365-70.

109. Murakami H, Nishioka S, Setterfield J, et al. Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 1998;17:39-44.
110. Ockleford C. The confocal laser scanning microscope (CLSM) *J Pathol*. 1995;176:1-2.
111. Paddock SW. Further developments of the laser scanning confocal microscope in biomedical research. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;213:24-31.
112. Dailey M, Marrs G, Satz J, Waite M. Concepts in imaging and microscopy. Exploring biological structure and function with confocal microscopy. *Biol Bull*. 1999;197:115-22.
113. Fink-Puches R, Hofmann-Wellenhof R, Smolle J, Kerl H. Confocal laser scanning microscopy: a new optical microscopic technique for applications in pathology and dermatology. *J Cutan Pathol*. 1995;22:252-9.
114. Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L, Dietrich A, Ruzicka T, von Braunmühl T. Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. *J Biophotonics*. 2015 May 21. doi: 10.1002/jbio.201500124. [Epub ahead of print]
115. Veiro JA, Cummins PG. Imaging of skin epidermis from various origins using confocal laser scanning microscopy. *Dermatology*. 1994;189:16-22.
116. Gammon WR, Robinson T, Briggaman RA, Wheeler CE Jr. Double immunofluorescence microscopy: a method for localizing immune deposits in skin diseases associated with linear basement membrane zone immunofluorescence. *J Invest Dermatol*. 1982;79:312-7.
117. Bruins S, de Jong MC, Heeres K, Wilkinson MH, Jonkman MF, van der Meer JB. Fluorescence overlay antigen mapping of the epidermal basement membrane zone: I. Geometric errors. *J Histochem Cytochem*. 1994;42:555-60.
118. Bruins S, De Jong MC, Heeres K, Wilkinson MH, Jonkman MF, Van der Meer JB. Fluorescence overlay antigen mapping of the epidermal basement membrane zone: II. Color fidelity. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:715-22.
119. Bruins S, De Jong MC, Heeres K, Wilkinson MH, Jonkman MF, Van der Meer JB. Fluorescence overlay antigen mapping of the epidermal basement membrane zone: III. Topographic staining and effective resolution. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:649-56.
120. De Jong MC, Bruins S, Heeres K, Jonkman MF, Nieboer C, Boorsma DM, Pas HH, van der Meer JB. Bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. Differentiation by fluorescence overlay antigen mapping. *Arch Dermatol*. 1996;132:151-7.
121. Kazama T, Yamamoto Y, Hashimoto T, Komai A, Ito M. Application of confocal laser scanning microscopy to differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol*. 1998;138:593-601.
122. Vodegel RM, de Jong MC, Pas HH, Yancey KB, Jonkman MF. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita: differentiation by use of indirect immunofluorescence microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48:542-7.

- 123.Wozniak K, Kazama T, Kowalewski C. A practical technique for differentiation of subepidermal bullous diseases: localization of in vivo-bound IgG by laser scanning confocal microscopy. *Arch Dermatol* 2003;139:1007-11.
- 124.Campos M, Silvente C, Lecona M, Suarez R, Lazaro P. Epidermolysis bullosa acquisita: diagnosis by fluorescence overlay antigen mapping and clinical response to high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31:71-3.
- 125.Sárdy M, Kostaki D, Varga R, Peris K, Ruzicka T. Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69:748-53.
- 126.Ingen-Housz-Oro S, Plée J, Belmondo T, Maizières M, Pham BN, Hüe S, Ortonne N, Durlach A, Wolkenstein P, Chosidow O, Bernard P. Positive Direct Immunofluorescence Is of Better Value than ELISA-BP180 and ELISA-BP230 Values for the Prediction of Relapse after Treatment Cessation in Bullous Pemphigoid: A Retrospective Study of 97 Patients. *Dermatology*. 2015;231:50-5.
- 127.Ardigò M, Agozzino M, Amorosi B, Moscarella E, Cota C, de Abreu L, Berardesca E. Real-time, non-invasive microscopic confirmation of clinical diagnosis of bullous pemphigoid using in vivo reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol*. 2014;20:194-9.
- 128.Ujiie H, Nishie W, Shimizu H. Pathogenesis of bullous pemphigoid. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2012;32:207-15
- 129.Ruocco E, Wolf R, Caccavale S, Brancaccio G, Ruocco V, Lo Schiavo A. Bullous pemphigoid: associations and management guidelines: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013;31:400-12.
- 130.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.
- 131.Nishie W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J Dermatol Sci*. 2014;73:179-86.
- 132.Cozzani E, Gasparini G, Burlando M, Drago F, Parodi A. Atypical presentations of bullous pemphigoid: Clinical and immunopathological aspects. *Autoimmun Rev*. 2015;14:438-45.
- 133.Balestri R, Magnano M, La Placa M, Patrizi A, Angileri L, Tengattini V, Bardazzi F. Malignancies in bullous pemphigoid: A controversial association. *J Dermatol*. 2015 Oct 5. doi: 10.1111/1346-8138.13079. [Epub ahead of print] .
- 134.Taghipour K, Chi CC, Bhogal B, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F. Immunopathological characteristics of patients with bullous pemphigoid and neurological disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 May;28:569-73.
- 135.Brick KE, Weaver CH, Savica R, Lohse CM, Pittelkow MR, Boeve BF, Gibson LE, Camilleri MJ, Wieland CN. A population-based study of the association between bullous pemphigoid and neurologic disorders. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71:1191-7.

- 136.Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Aoyama Y, Kitajima Y, Hashimoto T, Jones JC, Tsuruta D. Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. *Am J Pathol.* 2013;182:828-40.
- 137.Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Shibaki A, Shimizu H. Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation. *J Immunol.* 2014;193:4415-28.
- 138.Wu Y, Sun NN, Dang EL, Jin L, Liu ZF, Zhang W, Yang LT, Wang G. Anti-collagen XVII single-chain Fv antibody blocks the autoimmune reaction mediated by pathogenic autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2013;72:25-31.
- 139.Qian H, Kusuhara M, Li X, Tsuruta D, Tsuchisaka A, Ishii N, Koga H, Hayakawa T, Ohara K, Karashima T, Ohyama B, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. B-cell activating factor detected on both naïve and memory B cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* 2014;23:596-605.
- 140.Iwata H, Kitajima Y. Bullous pemphigoid: role of complement and mechanisms for blister formation within the lamina lucida. *Exp Dermatol.* 2013;22:381-5.
- 141.Provost TT, Tomasi TB Jr. Immunopathology of bullous pemphigoid. Basement membrane deposition of IgE, alternate pathway components and fibrin. *Clin Exp Immunol.* 1974;18:193-200.
- 142.Messingham KA, Holahan HM, Fairley JA. Unraveling the significance of IgE autoantibodies in organ-specific autoimmunity: lessons learned from bullous pemphigoid. *Immunol Res.* 2014;59:273-8.
- 143.Ujiie H. IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: supporting role, or leading player? *J Dermatol Sci.* 2015;78:5-10.
- 144.Moriuchi R, Nishie W, Ujiie H, Natsuga K, Shimizu H. In vivo analysis of IgE autoantibodies in bullous pemphigoid: a study of 100 cases. *J Dermatol Sci.* 2015;78:21-5.
- 145.Messingham KN, Srikantha R, DeGueme AM, Fairley JA. FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Immunol.* 2011;187:553-60.
- 146.Yayli S, Pelivani N, Beltraminelli H, Wirthmüller U, Belezny Z, Horn M, Borradori L. Detection of linear IgE deposits in bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid: a useful clue for diagnosis. *Br J Dermatol.* 2011;165:1133-7.
- 147.Fania L, Caldarola G, Müller R, Brandt O, Pellicano R, Feliciani C, Hertl M. IgE recognition of bullous pemphigoid (BP)180 and BP230 in BP patients and elderly individuals with pruritic dermatoses. *Clin Immunol.* 2012;143:236-45.
- 148.Bing L, Xiping Z, Li L, Jun P, Yi-Xia W, Min Y, Qing L, Qiu-Ning S, Hong-Zhong J, Ya-Gang Z. Levels of anti-BP180 NC16A IgE do not correlate with severity of disease in the early stages of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res.* 2015 Sep 24. [Epub ahead of print]

- 149.Kalowska M, Ciepiela O, Kowalewski C, Demkow U, Schwartz RA, Wozniak K. Enzyme-linked Immunoassay Index for Anti-NC16a IgG and IgE Auto-antibodies Correlates with Severity and Activity of Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. 2015 Mar 20. [Epub ahead of print]
- 150.Lin L, Bankaitis E, Heimbach L, Li N, Abrink M, Pejler G, An L, Diaz LA, Werb Z, Liu Z. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. *J Biol Chem*. 2011;286:37358-67.
- 151.Zebrowska A, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Stasikowska-Kanicka O, Kulczycka-Siennicka L, Wozniacka A, Waszczykowska E. Mediators of mast cells in bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:936545.
- 152.Günther C, Wozel G, Meurer M, Pfeiffer C. Up-regulation of CCL11 and CCL26 is associated with activated eosinophils in bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol*. 2011;166:145-53.
- 153.Tedeschi A, Marzano AV, Lorini M, Balice Y, Cugno M. Eosinophil cationic protein levels parallel coagulation activation in the blister fluid of patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:813-7.
- 154.Messingham KN, Holahan HM, Frydman AS, Fullenkamp C, Srikantha R, Fairley JA. Human eosinophils express the high affinity IgE receptor, FcεRI, in bullous pemphigoid. *PLoS One*. 2014;9:e107725.
- 155.Yalcin AD, Genc GE, Celik B, Gumuslu S. Anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) is effective in treating bullous pemphigoid and its effects on soluble CD200. *Clin Lab*. 2014;60:523-4.
- 156.Messingham KN, Pietras TA, Fairley JA. Role of IgE in bullous pemphigoid: a review and rationale for IgE directed therapies. *G Ital Dermatol Venereol*. 2012;147:251-7.
- 157.Yu KK, Crew AB, Messingham KA, Fairley JA, Woodley DT. Omalizumab therapy for bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71:468-74.
- 158.Antiga E, Quaglino P, Volpi W, Pierini I, Del Bianco E, Bianchi B, Novelli M, Savoia P, Bernengo MG, Fabbri P, Caproni M. Regulatory T cells in skin lesions and blood of patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28:222-30.
- 159.Pickford WJ, Gudi V, Haggart AM, Lewis BJ, Herriot R, Barker RN, Ormerod AD. T cell participation in autoreactivity to NC16a epitopes in bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol*. 2015;180:189-200.
- 160.Li Q, Liu Z, Dang E, Jin L, He Z, Yang L, Shi X, Wang G. Follicular helper T Cells (Tfh) and IL-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *PLoS One*. 2013;8:e68145.
- 161.Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, Furudate S, Aiba S. Bullous Pemphigoid Accompanied by Aplastic Anemia: The Induction of IL-17-Producing Cells in the Affected Areas of the Skin. *Case Rep Dermatol*. 2012;4:211-4.
- 162.Zebrowska A, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Stasikowska-Kanicka O, Cynkier A, Sysa-Jedrzejska A, Waszczykowska E. IL-17 expression in

dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:967987.

163. Le Jan S, Plée J, Vallerand D, Dupont A, Delanez E, Durlach A, Jackson PL, Blalock JE, Bernard P, Antonicelli F. Innate immune cell-produced IL-17 sustains inflammation in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2908-17.

164. Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Aiba S. Comparison of CD163+ CD206+ M2 macrophages in the lesional skin of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: the possible pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatology.* 2014;229:369-78.

165. Lin L, Betsuyaku T, Heimbach L, Li N, Rubenstein D, Shapiro SD, An L, Giudice GJ, Diaz LA, Senior RM, Liu Z. Neutrophil elastase cleaves the murine hemidesmosomal protein BP180/type XVII collagen and generates degradation products that modulate experimental bullous pemphigoid. *Matrix Biol.* 2012;31:38-44.

166. Hellberg L, Samavedam UK, Holdorf K, Hänsel M, Recke A, Beckmann T, Steinhorst K, Boehncke WH, Kirchner T, Möckel N, Solbach W, Zillikens D, Schmidt E, Ludwig RJ, Laskay T. Methylprednisolone blocks autoantibody-induced tissue damage in experimental models of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita through inhibition of neutrophil activation. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2390-9.

