

Rendimiento diagnóstico de la tinción inmunohistoquímica de colágeno IV para el diagnóstico de penfigoide ampuloso.

Daniela Astarot Salazar Uribe¹, Manuel Martínez Gómez², Jesús Alberto Plata Contreras³, Claudia Patricia Palacios Isaza⁴, Gloria Andrea Vargas Suaz⁵, Laura Carolina Álvarez Acevedo⁶, Diana Lucia Meneses Toro⁷, Juan Pablo Ospina Gómez⁸.

Residente Dermatología Universidad de Antioquia¹, Dermatólogo Universidad de Antioquia², Dermatólogo Universidad de Antioquia³, Jefe departamento de Medicina Física y Rehabilitación Universidad de Antioquia – Epidemiólogo³, Dermatóloga Universidad de Antioquia⁴, Dermatóloga Universidad de Antioquia⁵, Microbióloga Universidad de Antioquia⁶, Bacterióloga y laboratorista clínico Universidad de Antioquia⁷, Dermatopatólogo Universidad de Antioquia⁸. Grupo de investigación CIDERM.

Correspondencia autor: Daniela Astarot Salazar Uribe, Calle 49^a #81-33 Medellín-Colombia, celular: 3007334350, correo: danielaastarot@gmail.com

Abstract

Introducción: para el diagnóstico de penfigoide ampuloso (PA) es necesario la realización de una biopsia de piel para tinción de hematoxilina eosina (H&E) en parafina y otra biopsia tomada de piel perilesional para realización de inmunofluorescencia directa (IFD) idealmente con de hendidura salina para confirmar el origen autoinmune de la enfermedad y establecer los diagnóstico diferenciales con otras las enfermedades ampollosas subepidérmicas. En un estudio se demostró que la realización de inmunohistoquímica (IHQ) de colágeno tipo IV es un método simple que tiene relevancia en el diagnóstico de las enfermedades ampollosas subepidérmicas y en el penfigoide ampuloso con positividad en la porción dérmica de la ampolla. Hasta donde sabemos no hay estudios en la actualidad que analicen y comparen el rendimiento entre la IFD y la IHQ de colágeno tipo IV.

Objetivo: determinar la utilidad diagnóstica de la tinción inmunohistoquímica de colágeno IV comparado con inmunofluorescencia directa en pacientes con penfigoide ampuloso. Además caracterizar los patrones histopatológicos, inmunofluorescencia directa en pacientes con diagnóstico de PA.

Resultados: este estudio demostró la positividad del colágeno tipo IV en la porción dérmica de la ampolla en el 91% de los casos de PA confirmados por IFD positiva, con una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del penfigoide ampuloso, con un rendimiento similar a la IFD de IgG.

Conclusiones: la estandarización de la IHQ de colágeno tipo IV genera impacto en el diagnóstico de PA y puede ser usada como alternativa ante la ausencia de IFD.

Palabras claves: *penfigoide ampolloso, inmunohistoquímica, colágeno tipo IV, inmunofluorescencia directa, enfermedades ampollas de la piel.*

INTRODUCCIÓN

El PA es la enfermedad ampollosa subepidérmica más frecuente, causada por la formación de anticuerpos contra antígenos de la membrana basal.¹⁻² Este mecanismo está mediado principalmente por autoanticuerpos dirigidos hacia dos proteínas hemidesmosomales, los antígenos BP180 y BP230.³⁻⁴ Generalmente afecta a adultos mayores con una edad promedio entre los 60 a 80 años.⁵ La presentación clínica es variable, donde el prurito puede ser el único síntoma, o asociarse con lesiones eccematosas, papulares o urticariales, las cuales pueden estar presentes durante meses o años, previo a la aparición de lesiones ampollas.¹ La presentación clásica de la enfermedad se caracteriza por la aparición de vesículas o ampollas tensas, con o sin base eritematosa, que miden entre 1 y 4 cm de diámetro, con un contenido seroso o hemorrágico, que posteriormente se erosionan formando costras.⁶ Se localizan en tronco o extremidades, comprometiendo en ocasiones la cavidad oral.⁷

Para confirmar el diagnóstico se realiza una biopsia de piel para H&E que evidencia la ampolla subepidérmica y un infiltrado dérmico eosinofílico, sumando a otra biopsia perilesional para la realización de IFD que detecta los depósitos lineales de IgG y/o C3 en la membrana basal, con la ayuda de la hendidura salina para la separación de la membrana basal, determinando localización en la porción epidérmica o dérmica de la ampolla. La IFD es considerada el estándar de oro, sin embargo, esta debe ser realizada en tejido fresco, requiere insumos de alto costo y entrenamiento especializado para su interpretación.⁴⁻⁸⁻⁹

En el 2018 se encontró que la inmunohistoquímica (IHQ) de colágeno tipo IV es simple para el diagnóstico diferencial de las enfermedades ampollas subepidérmicas autoinmunes.¹⁰ Sin embargo no se ha implementado su uso de manera extendida en el diagnóstico de las enfermedades ampollas subepidérmicas.

Por lo tanto el presente estudio busca determinar el rendimiento diagnóstico de la IHQ de colágeno tipo IV en tejido de parafina comparado con IFD en corte por congelación en pacientes con PA entre los años 1976 y 2022 en el servicio de Dermatología Universidad de Antioquia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de pruebas diagnósticas en pacientes con diagnóstico de PA, los criterios de inclusión fueron IFD de piel positiva con depósitos lineales en la porción epidérmica y/o dérmica de la ampolla realizada con hendidura salina, IFD positiva de piel con depósitos lineales en la membrana basal y la existencia del bloque de parafina.

El estudio se realizó con previo aval del comité de ética de la Universidad de Antioquia en el acta No.039 y fue realizado de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

Recolección datos

Se realizó una revisión retrospectiva de 125 casos de la base de datos del Sección de Dermatología Universidad de Antioquia, con posterior extracción de bloques de parafina, incluyendo casos desde 1976 hasta el año 2022 de pacientes con diagnóstico confirmado de PA. Se realizó la revisión de cada placa de H&E y se verificaron los patrones descritos de la IFD por el investigador principal y dos dermatopatólogos expertos. Después de aplicar los criterios de inclusión se logró la recopilación de 55 casos.

Estandarización de inmunohistoquímica para colágeno tipo IV

La tinción de IHQ se realizó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Colágeno IV (CIV22) Vitro Master Diagnóstica, listo para su uso, las muestras fueron previamente fijadas en formalina tamponada e incluidas en parafina, se realizaron secciones de corte a 4 micras de espesor y fueron montadas en portaobjetos de microscopio cargados, el desenmascaramiento antigénico se logró con EDTA Buffer (10x) Thermo Scientific pH 8 a 95°C durante 20 minutos, seguido de tratamiento enzimático con Proteinasa K en una dilución de 1:1000 microlitros durante 5 minutos a temperatura ambiente, en el lavado se utilizó Tris Buffered Saline & Tween 20 (20X) Thermo Scientific, para el procedimiento inmunohistoquímico que incluye bloqueo y marcado enzimático se utilizó el kit UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Thermo Scientific y UltraVision Hydrogen Peroxide Block Thermo Scientific, el revelado de la reacción colorimétrica se logra mediante DAB Quanto Thermo Scientific, el contraste se hace con hematoxilina por 30 segundos, el montaje se realiza con cubreobjetos y Consul Mount Thermo Scientific.

La lectura de la tinción de IHQ de colágeno tipo IV se hizo en un microscopio estándar y se tomaron microfotografías con el microscopio Leica DM500 con el software Leica Application Suite 4.8 (LAS V4.8) a escala de 10x y 40x.

Análisis de datos

Para el cálculo del rendimiento diagnóstico de la prueba, se determinaron la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), igualmente se aplicó el teorema de Bayes implementando el paquete estadístico EPIDAT 3.1, se registraron las 55 muestras analizadas y 3 controles: 2 piel sana y 1 epidermólisis ampollosa adquirida (**Figura 1-2**), se comparó su rendimiento con la IFD IgG positiva en los casos y se incluyeron su respectiva figura ROC.

RESULTADOS

Se analizaron 55 muestras que correspondieron a pacientes con diagnóstico de PA confirmado por IFD positiva. La histopatología de las muestras evidencio que en el 94% de los casos (n=52) la ampolla tenía ubicación subepidérmica, y en el 70.9% de los casos (n=37) el tamaño de la ampolla fue extensa, con contenido inflamatorio mixto en el 30.9% y presencia de eosinófilos de 2 a 10 por campo de 40x en el 29% de los casos. (**Tabla 1**). Con respecto a la revisión de las IFD 53 casos (96,3%) presentaron IgG positiva, con un depósito lineal en el 72,4%, localizado en la porción epidérmica en el 50% de los casos. Seguido de C3 que presento positividad en el 74,5%, con deposito lineal en el 56,3%, localizado en la porción epidérmica en el 40% de los casos. (**Tabla 2**).

De los 55 casos a los que se les realizo IHQ de colágeno tipo IV, 50 casos tuvieron positividad en la porción dérmica y 5 casos fueron negativos (**Figura 3**). Arrojando así una sensibilidad del 91%, especificidad del 100%, VPP del 100%, VPN del 37,5% para la tinción de IHQ colágeno tipo IV para el diagnóstico de PA comparada con la IgG por IFD (**Tabla 3**). La curva ROC evidencia la capacidad que tiene la prueba en discriminar a los pacientes con diagnóstico de PA (**Figura 4**).

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la tinción de IHQ de colágeno tipo IV en 55 casos confirmados de PA con IFD positiva. Se presentó positividad lineal de la tinción en la porción dérmica de la ampolla en el 91% de los casos, este hallazgo fue congruente con la revisión de la tinción de H&E que tenían ampolla intacta, esta positividad se puede explicar por la ubicación del colágeno tipo IV en la lámina densa de la membrana basal, por lo que se destaca la necesidad de tener una ampolla intacta para la realización de la prueba de IHQ de colágeno tipo IV para el diagnóstico de PA. En los 5 casos restantes que fueron negativos, la tinción de H&E evidenció que estaban en la fase urticarial de la enfermedad.

En un estudio descriptivo del 2018 evaluaron la utilidad de la IHQ del colágeno tipo IV en el diagnóstico diferencial de enfermedades ampollosas subepidérmicas, analizaron 28 casos, de los cuales 24 correspondían a PA, evidenciando que la tinción lineal en la porción dérmica de la ampolla estaba presente en todos los casos.¹⁰⁻¹¹

Es importante resaltar que en los pacientes con diagnóstico de epidermolisis ampollosa adquirida, el principal diagnóstico diferencial del PA, el colágeno tipo IV es positivo en la porción epidérmica de la ampolla, en el estudio descriptivo previamente mencionado se confirmó este hallazgo, de igual manera en otro estudio en caninos, evaluando 10 casos, 6 tuvieron positividad en ambas porciones (epidérmica y dérmica) y 4 en la porción epidérmica.¹²

Con respecto a la sensibilidad calculada del 91%, especificidad del 100%, VPP del 100% y VPN del 37.5% para la tinción de IHQ colágeno tipo IV, al ser comparada la sensibilidad del 96.4%, la especificidad del 100%, el VPP del 100% y el VPN del 60% de la IgG por IFD, se demostró que la tinción de IHQ de colágeno tipo IV tiene un rendimiento óptimo comparado con el estándar de oro, sin lograrse encontrar al momento de nuestra búsqueda una publicación que permita comparar estos resultados con otras investigaciones.

Como fortalezas es importante destacar la cantidad de muestras analizadas en las que se realizó la tinción de IHQ de una enfermedad poco prevalente, además de esto, la posibilidad de verificar la positividad de la IFD positiva para IgG y/o C3 y las tinciones de H&E de cada caso.

Como limitantes al momento de la búsqueda retrospectiva de la información de los 125 casos en la base de datos de la IFD, solo se pudieron incluir 55 por la carencia de bloques de parafina, por lo que se hace necesario siempre conservar una muestra de este tipo para la realización posterior de la IHQ. Además al definir la muestra no se calculó un tamaño de muestra como tal, se aplicó un muestreo por conveniencia por tratarse de una enfermedad poco prevalente, además se incluyeron 3 controles (2 piel normal y 1 epidermolisis ampollosa adquirida) lo que explica el rango amplio del VPN.

Nuestro estudio confirma el valor diagnóstico de la tinción IHQ de colágeno tipo IV para el diagnóstico de PA comparado con IgG por IFD, con un gran impacto en el proceso diagnóstico de PA en nuestro medio, ya que a diferencia de la IFD, es una técnica menos costosa, fácil de estandarizar, no requiere tejido fresco, protocolos de transporte estrictos, equipos de alto costo, solo requiere una biopsia de piel, la muestra perdura en el tiempo, situaciones que finalmente resuelven importantes

limitaciones en la implementación de la IFD, proponiendo esta prueba como un estudio complementario para el diagnóstico de PA, incluso en casos donde la IFD no este disponible.

Agradecimiento: Servicio dermatopatología Universidad de Antioquia, Esteban Chica Plaza, *monitor de la sección de Dermatología, Universidad Antioquia*

Financiamiento: Asocolderma (Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica)

REFERENCIAS

1. Bernard P, Antonicelli F. Bullous Pemphigoid: A Review of its Diagnosis, Associations and Treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2017 Aug 1, 18(4):513–28.
2. Wertenteil S, Garg A, Strunk A, Alloo A. Prevalence estimates for pemphigoid in the United States: A sex-adjusted and age-adjusted population analysis. *J Am Acad Dermatol.* 2019 Mar 1;80(3):655–9.
3. Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. Pemphigoid diseases: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Autoimmunity.* 2012 Feb;45(1):55–70.
4. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):477–81.
5. Zuluaga C, Del Rio Y. Estudio retrospectivo clínico-epidemiológico de los pacientes con pénfigo y penfigoide ampolloso del Hospital Universitario San Vicente Fundación. *Asocolderma Revista.* 2017; 25: 2 (abril-junio), 118-129.
6. Fuertes de Vega I, Iranzo-Fernández P, Mascaró-Galy JM. Bullous pemphigoid: clinical practice guidelines. *Actas Dermosifiliogr.* 2014 May; 105(4):328–46.
7. Bruch-Gerharz D, Hertl M, Ruzicka T. Mucous membrane pemphigoid: clinical aspects, immunopathological features and therapy. *Eur J Dermatol.* 2007 May;17(3):191–200.
8. 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 Nov 69(5):748–53.
9. Diercks GF, Pas HH, Jonkman MF. Immunofluorescence of Autoimmune Bullous Diseases. *Surg Pathol Clin.* 2017 Jun 1;10(2):505–12.

10. H Lee, S Ham. The Value of Type IV Collagen Immunohistochemical Staining in the Differential Diagnosis of Autoimmune Subepidermal Bullous Diseases. Acta Dermatovenerol Croat. 2018; 26(2):133–8.
11. Kamaguchi M, Iwata H, Nishie W. The direct binding of collagen XVII and collagen IV is disrupted by pemphigoid autoantibodies. Lab Invest. 2019 Jan;99(1):48-57.
12. Olivry T, Dunston SM. Usefulness of collagen IV immunostaining for diagnosis of canine epidermolysis bullosa acquisita. Vet Pathol. 2010; 47(3):565–8.

Tabla 1. Descripción histopatológica (H&E) del penfigoide ampolloso			
		n= 55	%
Preampolla*	No	47/55	85,40%
	Si	8 /55	14,60%
Ubicación ampolla	Subepidérmica	52/55	94%
	Intraepidérmica	3/55	6%
Tamaño ampolla	Extensa	39/55	70,90%
	Focal	11/55	20%
	No aplica	5/55	9%
Contenido ampolla	Mixto	17/55	30,90%
	Eosinófilos	9/55	16,30%
	Seroso	7/55	12,70%
	Vacío	5/55	9,10%
	Hemorrágico	5/55	9,10%
	Neutrófilos	10/55	18,20%
Otro	2/55	3,60%	
Inflamación	Si	46/55	83,30%
	No	9/55	16,30%
Tipo de infiltrado**	Crónico	47/55	85,50%
	Agudo	4/55	7,30%
	Mixto	1/55	1,80%
	Ausente	3/55	5,50%
Cantidad de eosinófilos***	+	29/55	52,70%
	++	19/55	34,50%
	+++	7/55	12,80%
Espangiosis	Si	37/55	67,30%
	No	18/55	32,70%
Reepitelialización	No	48/55	87,20%
	Si	7/55	12,70%

Preampolla**: ligero edema subepidérmico con inicio de formación de la hendidura, *Tipo de infiltrado**: agudo: neutrófilos y crónico: linfocitos, plasmocitos, eosinófilos, histiocitos , *****Cantidad eosinófilos por campo de 40X**: < 2 (+), 2-10 (++) , >10 (+++).

Tabla 2. Patrones de IFD IgG, IgM, IgA, C3 para PA.									
	IgG		C3		IgM		IgA		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Positivo	53	96,4%	42	76,40%	7	12,70%	5	10%	
Negativo	0	0	9	16,30%	39	71,00%	40	72%	
Sin dato	2	3,6%	4	7,30%	9	16,30%	10	18%	
Tipo del depósito									
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Lineal	41	74,6%	33	60%	4	7,30%	4	7,30%	
Granular	4	7,3%	3	5,50%	2	3,60%	1	1,80%	
Intercelular	2	3,6%	2	3,60%	0	0	0	0	
Focal	1	1,8%	0	0,00%	0	0	0	0	
Negativo	0	0	9	16,30%	38	69,10%	38	69,10%	
Sin dato	7	12,7%	8	14,60%	11	20%	12	21,80%	
Localización del depósito									
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Membrana basal	16	29%	13	23%	6	11%	3	5,50%	
Porción epidérmica	30	54%	22	40%	1	1,80%	2	3,60%	
Porción dérmica	4	7,3%	5	10%	0	0	0	0	
Negativo	0	0%	8	14,60%	38	69,10%	39	70,90%	
Sin dato	5	10%	7	12,70%	10	18%	11	20%	

Tabla 3. Comparación de la IHQ de colágeno tipo IV como prueba diagnóstica en el PA frente a la IgG por IFD.

Diagnóstico PA	IHQ colágeno tipo IV	IFD para IgG
Sensibilidad % (IC 95%)	91 (82,4 – 99,4)	96,4 (90,5 - 100)
Especificidad % (IC 95%)	100 (83,3 -100)	100 (83,3 -100)
VPP % (IC 95%)	100 (99 -100)	100 (99 -100)
VPN % (IC95%)	37,5 (0 -77,3)	60 (7,1 -100)

VPP: valor predictivo positivo, **VPN:** valor predictivo negativo.

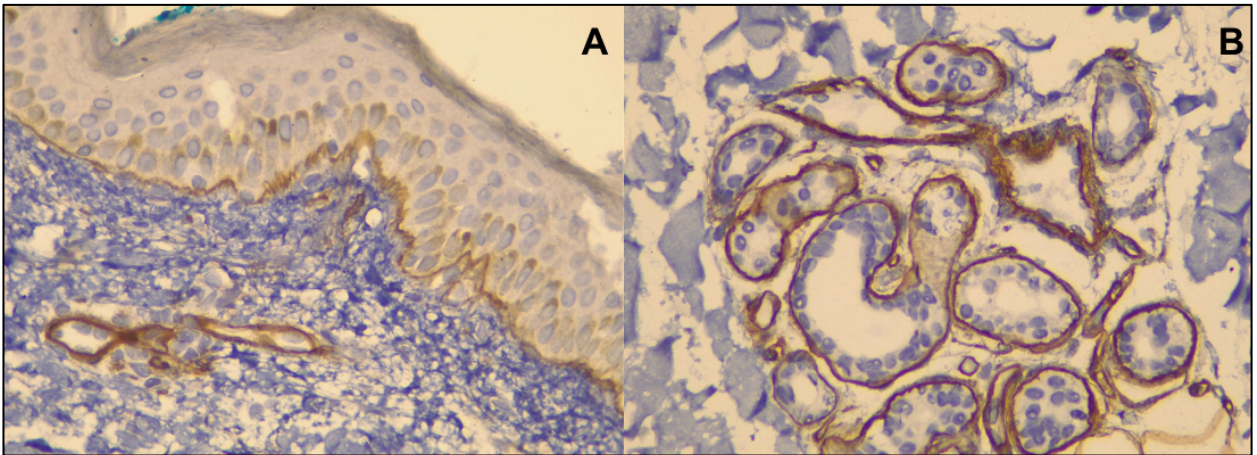


Figura 1. (A) Positividad de la IHQ colágeno tipo IV en la piel normal de la unión dermo epidérmica **(B)**. Positividad en la membrana basal de los conductos ecrinos de la piel normal. (40x)

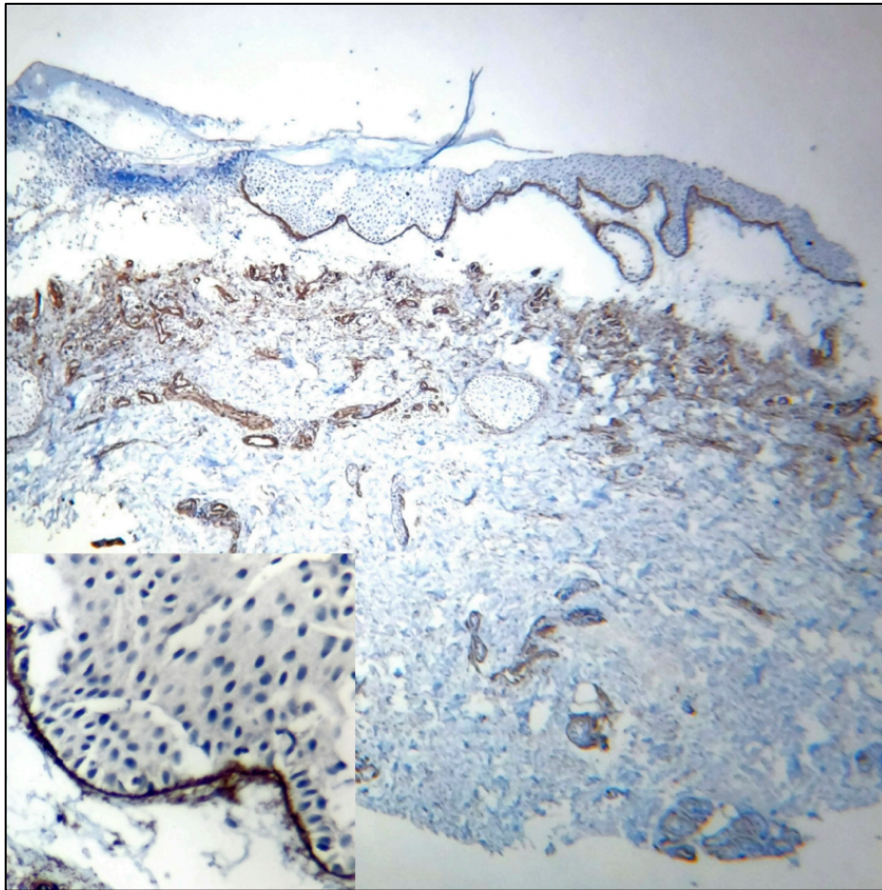


Figura 2. Epidermólisis ampollosa. Positividad de la IHQ colágeno tipo IV en la porción epidérmica de la ampolla. (10x - 40x)

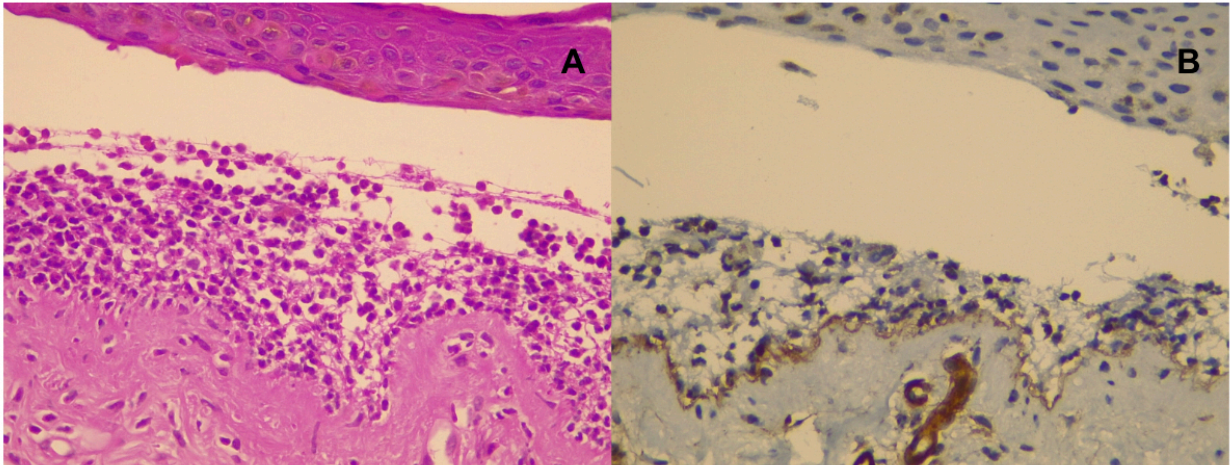


Figura 3. (A) Penfigoide ampoloso. Ampolla subepidérmica, extensa, con infiltrado crónico.
(B) Positividad de la IHQ colágeno tipo IV en la porción dérmica de la ampolla. (40x)

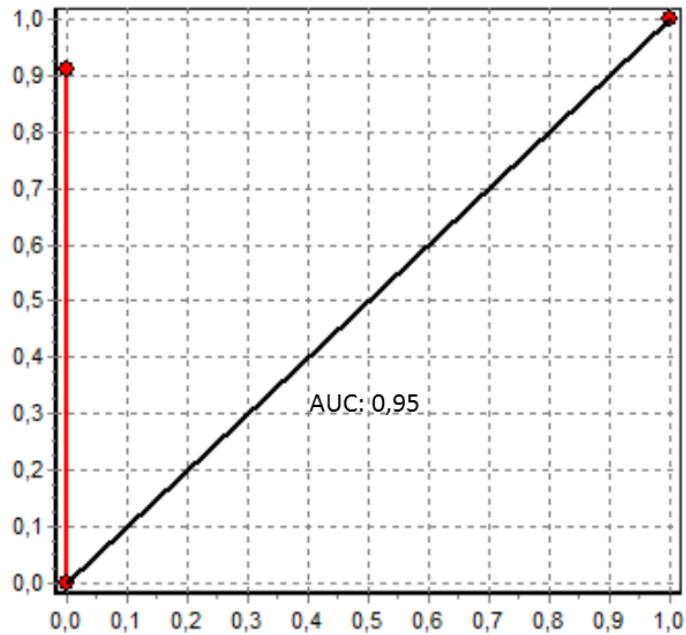


Figura 4. Curva ROC de colágeno tipo IV para el diagnóstico de PA. La línea negra representa la capacidad de esta prueba de IHQ para discriminar entre afectados de PA y no afectados con esta enfermedad y la línea roja representa la sensibilidad y especificidad de la prueba en la curva ROC. En pacientes con PA la curva nos muestra una sensibilidad del 91% y especificidad del 100% para este inmunomarcador.