



ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at
www.actasdermo.org



E-CASOS CLÍNICOS

Descripción de 2 casos de penfigoide anti-p200. Utilidad de una técnica inmunohistoquímica sencilla en el diagnóstico diferencial con otras enfermedades ampollosas autoinmunes



I. García-Díez^{a,*}, M.E. Martínez-Escala^a, N. Ishii^b, T. Hashimoto^b,
J.M. Mascaró Galy^c, R.M. Pujol^a y J.E. Herrero-González^a

^a Departamento de Dermatología, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, España

^b Departamento de Dermatología, Facultad de Medicina de la Universidad de Kurume, Fukuoka, Japón

^c Departamento de Dermatología, Hospital Clínic, Barcelona, España

PALABRAS CLAVE

Laminina gamma-1;
Penfigoide anti-p200;
Enfermedades
ampollosas;
Inmunoblot;
Colágeno tipo IV

KEYWORDS

Laminin gamma 1;
Anti-p200
pemphigoid;
Bullous skin diseases;
Immunoblotting;
Collagen type IV

Resumen El penfigoide anti-p200 es una enfermedad ampollosa subepidérmica autoinmune infrecuente, asociada a la presencia de anticuerpos circulantes de tipo IgG dirigidos frente a la laminina gamma-1, una proteína de 200 kDa localizada en la lámina lúcida de la membrana basal. Revisamos las características clínicas, histopatológicas e inmunológicas de los 2 primeros casos descritos en España. El penfigoide anti-p200 comparte hallazgos histopatológicos e inmunopatológicos con la epidermólisis ampollosa adquirida, su principal diagnóstico diferencial. Sin embargo, su manejo sigue las mismas pautas descritas para el penfigoide ampolloso. El diagnóstico se confirma mediante *immunoblot*, una técnica compleja y accesible en pocos centros. Proponemos la detección mediante inmunohistoquímica del colágeno IV en el suelo de la ampolla, combinándola con las técnicas habituales de inmunofluorescencia, como alternativa sencilla y disponible, para diferenciarlo de la epidermólisis ampollosa adquirida.

© 2016 AEDV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Usefulness of a Simple Immunohistochemical Staining Technique to Differentiate Anti-p200 Pemphigoid From Other Autoimmune Blistering Diseases: A Report of 2 Cases

Abstract Anti-p200 pemphigoid is a rare autoimmune subepidermal blistering disease characterized by the presence of circulating immunoglobulin G antibodies directed against laminin gamma-1, a 200-kDa protein located in the lamina lucida of the basement membrane. We

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: 60495@parcdesalutmar.cat, irenegds7@hotmail.com (I. García-Díez).

review the clinical, histopathological and immunological characteristics of the first 2 cases described in Spain. Anti-p200 pemphigoid shares histopathological and immunopathological findings with epidermolysis bullosa acquisita, the main entity in the differential diagnosis. However, its management follows the same guidelines as those used for bullous pemphigoid. The diagnosis is confirmed by immunoblotting, which is a complex technique available in few centers. We propose the immunohistochemical detection of collagen type IV on the floor of the blister, combined with standard immunofluorescence techniques, as a simple, accessible alternative to differentiate anti-p200 pemphigoid from epidermolysis bullosa acquisita.

© 2016 AEDV. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El penfigoide anti-p200 es una enfermedad ampollosa subepidérmica autoinmune descrita por Zillikens et al. en 1996¹, a raíz del caso de un varón de 54 años con una erupción ampollosa generalizada, asociada a la presencia de anticuerpos IgG frente a una proteína de 200 kDa localizada en la porción inferior de la lámina lúcida. Posteriormente se han publicado 91 casos adicionales, siendo la incidencia real desconocida².

Presentamos los 2 primeros casos descritos en España.

Casos clínicos

Caso 1

Se trata de un varón de 65 años, con antecedentes de artritis de Horton tratada con glucocorticoides orales a dosis

bajas y de penfigoide ampoloso (PA) diagnosticado 3 años atrás en otro centro. Acudió a nuestro departamento por un nuevo brote de lesiones pruriginosas. La exploración física evidenció ampollas tensas y placas urticariformes de predominio en las extremidades inferiores, con elementos aislados en el tronco, sin afectación de las mucosas.

La biopsia de piel lesional evidenció una ampolla subepidérmica y un infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos a lo largo de la membrana basal (MB), con microabscesos papilares de neutrófilos y algún foco de espongiosis eosinofílica. En la inmunofluorescencia (IF) directa se observaron depósitos lineales de C3 e IgG en la MB. En la IF indirecta sobre piel separada con cloruro sódico 1 M se detectaron anticuerpos IgG circulantes dirigidos contra la MB en su parte dérmica (fig. 1). La detección de anticuerpos anti-BP180 y anti-colágeno VII por ELISA fue negativa. En el inmunoblot con extractos dérmicos de piel humana, realizado según métodos descritos previamente, se detectaron anticuerpos IgG frente a una proteína de 200 kDa (fig. 2)³.

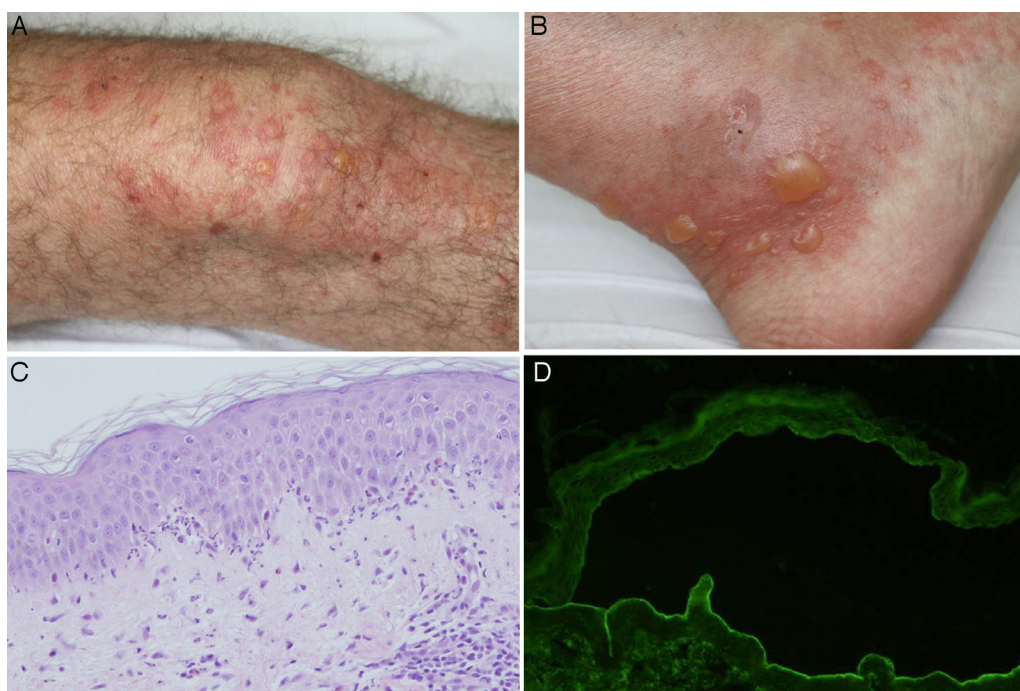


Figura 1 A y B. Ampollas tensas sobre una base urticariforme localizadas en la rodilla y en el tobillo. C. Infiltrado neutrofílico con algunos eosinófilos a lo largo de la membrana basal, con formación de microabscesos papilares (hematoxilina-eosina $\times 200$). D. Presencia de anticuerpos de clase IgG dirigidos contra el lado dérmico de la ampolla en la inmunofluorescencia indirecta sobre piel separada con cloruro sódico 1 M (dilución de anticuerpos de 1/40).

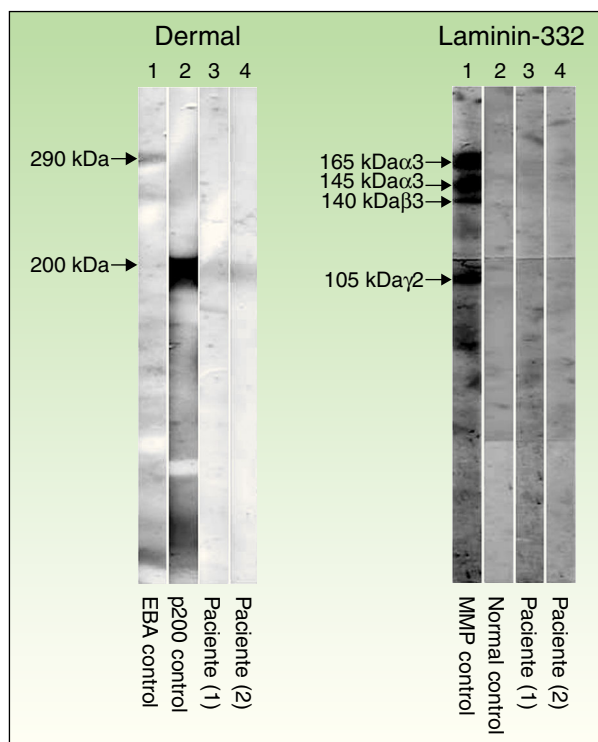


Figura 2 Técnica de inmunoblot realizada con extractos dérmicos de piel humana, obtenidos mediante piel separada con ácido tetracético etilendiamina y sometidos a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, según el método de Laemmli (izquierda), así como inmunoblot con laminina 332 recombinante (derecha). En la parte izquierda (extractos dérmicos de piel humana) se observa que los sueros de los pacientes 1 y 2 (corresponden a las columnas 3 y 4 respectivamente) reconocen una banda de 200 kDa que se corresponde con la misma banda que detecta el suero de otro paciente con penfigoide anti-p200 (columna 2), mientras que el suero de un paciente con epidermolísis ampollosa adquirida (columna 1) no detecta dicha banda, pero sí una de 290 kDa, correspondiente al colágeno VII. En la parte derecha (laminina 332 recombinante) se observa que el suero de los pacientes 1 y 2 (columnas 3 y 4), al igual que el suero control sano (columna 2), no detectan la proteína recombinante, mientras que el suero de un paciente con penfigoide anti-laminina 332 (columna 1) detecta varias bandas de 165, 145, 140 y 105 kDa, que corresponden a las cadenas $\alpha 3$, $\beta 3$, y $\gamma 2$ de la laminina 332, respectivamente.

Se inició tratamiento con clobetasol tópico según la pauta para el PA moderado-grave⁴, y se mantuvo la dosis de prednisona (10 mg/día) para su arteritis, con buena respuesta. El paciente presentó un nuevo brote de ampollas al disminuir la dosis de corticoides orales a 5 mg/día. Se aumentó la prednisona a 20 mg/día y se añadió dapsona 50 mg/día con mejoría clínica. Finalmente se mantuvo libre de lesiones con dapsona 75 mg/día y prednisona 7,5 mg/día.

Caso 2

Un varón de 43 años con antecedentes de psoriasis en placas. Dieciséis meses antes, coincidiendo con un evento estresante, había presentado un brote de ampollas tensas

en la cara, el cuero cabelludo, los genitales y las ingles, sin afectación de las mucosas, para el cual había recibido tratamiento con prednisona a dosis de 0,5 mg/kg/día, con remisión del mismo. Posteriormente había presentado nuevos brotes de lesiones, para los que había realizado tratamiento con ciclosporina (sin éxito) en otro centro, respondiendo finalmente a dosis altas de dapsona (200 mg/día).

La exploración física en su primera visita evidenció múltiples placas eritemato-descamativas en el tronco y en las extremidades, correspondientes a lesiones de psoriasis, junto con máculas y placas hiperpigmentadas de predominio en las extremidades superiores. En la biopsia cutánea se observó una ampolla subepidérmica con abundantes polimorfonucleares y microabscesos de neutrófilos en papilas dérmicas. Los resultados de las IF directa e indirecta y de los ELISA anti-BP180 y anti-colágeno VII fueron idénticos a los descritos en el primer paciente (fig. 3). Se realizó además un estudio inmunohistoquímico para colágeno IV con el bloque de parafina, y a diferencia del paciente anterior, se observó un marcaje intenso del suelo de la ampolla (fig. 4). El *inmunoblot* confirmó el diagnóstico de penfigoide anti-p200 (fig. 2).

Dada la práctica remisión de las lesiones con dapsona 200 mg/día y la mala tolerancia del paciente por presentar astenia, se redujo progresivamente su dosis hasta suspenderla, con aparición intermitente de alguna vesícula aislada resuelta mediante glucocorticoides tópicos potentes.

Discusión

El penfigoide anti-p200 es una enfermedad ampollosa de reciente descripción^{1,2,5,6}. Los pacientes suelen ser adultos de edad media (< 65 años) con ampollas tensas y placas urticariformes pruriginosas generalizadas, con características clínicas similares al PA o la forma inflamatoria de la epidermolísis ampollosa adquirida (EAA)^{2,5,6}. En aproximadamente el 20% de los casos se observan lesiones mucosas^{2,5,6}. Las ampollas suelen resolverse sin dejar cicatrices o quistes de milium^{2,5}. Se ha observado una alta prevalencia de psoriasis (30%)^{2,5-7}. Algunos casos se han relacionado con fármacos (penicilina) o la fototerapia PUVA^{6,8}.

Los hallazgos histopatológicos característicos son la presencia de una ampolla subepidérmica acompañada de un infiltrado inflamatorio en la dermis superficial, habitualmente neutrofílico, y menos frecuentemente eosinofílico^{2,5,6,9}. Ocasionalmente pueden observarse microabscesos de neutrófilos en las papilas dérmicas y espongiosis neutrofílica o eosinofílica^{2,5,6,9}.

Los estudios de IF directa revelan depósitos lineales de C3 y/o IgG en la MB. La IF indirecta sobre piel separada con cloruro sódico 1 M evidencia anticuerpos circulantes de clase IgG dirigidos contra el lado dérmico de la ampolla, aunque ocasionalmente se han observado depósitos a ambos lados^{1,2,5,6,9}.

El diagnóstico se establece mediante el *inmunoblot* con extractos dérmicos de piel humana, en el que el suero de los pacientes reacciona contra una proteína de 200 kDa^{1,2,5}. En un 25% de los casos se ha objetivado una reactividad más débil con otros antígenos, como el BP180, el BP230 o la laminina 332, lo que podría explicarse por un fenómeno de

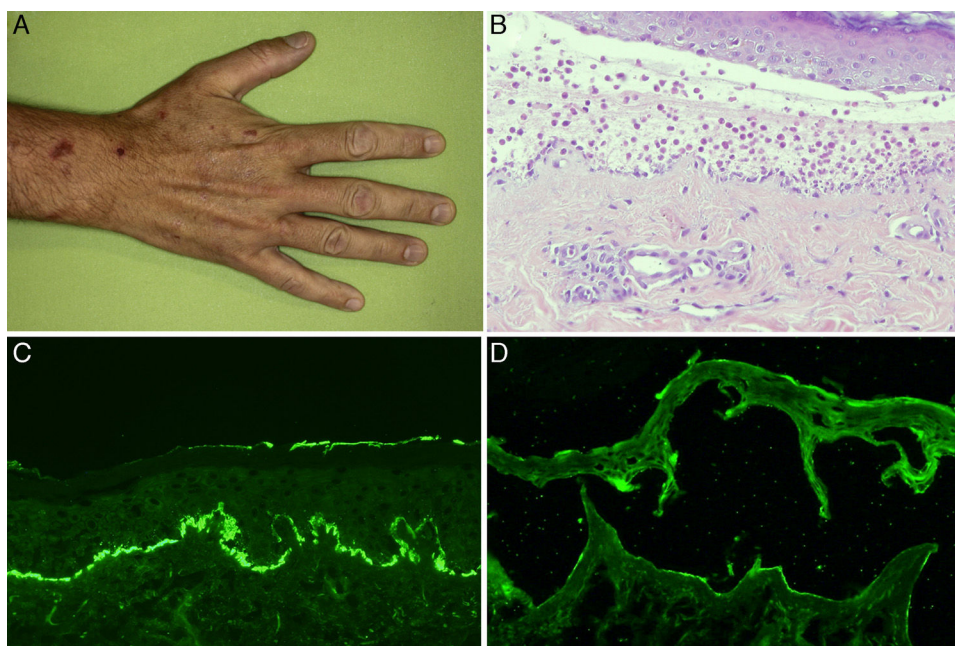


Figura 3 A. Máculas y placas hiperpigmentadas en la mano. B. Ampolla subepidérmica con abundantes polimorfonucleares en su interior (hematoxilina-eosina, $\times 200$). C. Depósito lineal en membrana basal de C3 en la inmunofluorescencia directa. D. Marcaje débil de anticuerpos de clase IgG dirigidos contra el lado dérmico de la ampolla en la inmunofluorescencia indirecta sobre piel separada con cloruro sódico 1 M (dilución de anticuerpos de 1/10).

expansión intermolecular de epítomos^{2,5,6,10}. El *inmunoblot* es una técnica compleja disponible en pocos laboratorios, lo que probablemente ha limitado el diagnóstico de algunos casos de penfigoide anti-p200.

El estudio inmunohistoquímico de los componentes de la MB en biopsias de ampollas recientes fijadas en parafina, permite localizar habitualmente el colágeno IV (que marca

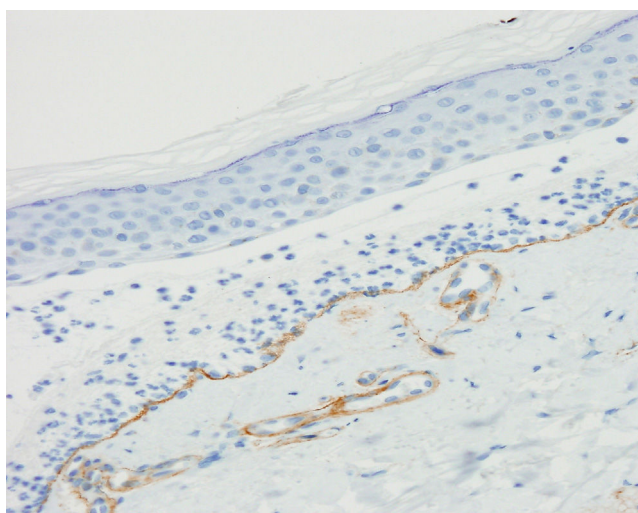


Figura 4 En el estudio inmunohistoquímico con colágeno IV se observa la tinción de la parte dérmica de la ampolla, que demuestra que esta se encuentra por encima de la lámina densa, así como de la pared de los vasos dérmicos (colágeno IV $\times 200$).

la lámina densa) en el lado dérmico de la ampolla, ayudando al diagnóstico cuando el *inmunoblot* no está disponible⁹.

En el momento actual persisten importantes incógnitas respecto a la etiopatogenia del penfigoide anti-p200². El antígeno p-200 es una proteína no colágena, localizada en la interfase entre la lámina lúcida y la lámina densa de la MB. Recientemente se ha identificado la laminina gamma-1 como el autoantígeno en el 90% de los casos, con un epítipo localizado en el residuo del aminoácido 246 carboxiterminal^{5,7,11}. Sin embargo, todos los intentos por demostrar la patogenicidad de los anticuerpos contra la fracción carboxiterminal de la laminina gamma-1 han resultado fallidos¹²⁻¹⁴.

El diagnóstico diferencial debe establecerse con otras enfermedades ampollas subepidérmicas con depósitos de C3 y/o IgG lineales en la IF directa, principalmente con el PA y la EAA^{2,5}. La IF indirecta sobre piel separada (o la IF directa sobre piel separada cuando no se detecten anticuerpos circulantes) nos permite distinguirlo del PA, pero no de la EAA. En estos casos, la inmunohistoquímica para el colágeno IV es una técnica sencilla que nos permitiría diferenciar el penfigoide anti-p200 de la EAA: encontraríamos el colágeno IV en el suelo de la ampolla en el primero y en el techo en la segunda. Sin embargo, esta puede no ser informativa en casos con intensos infiltrados inflamatorios⁹. Estos hallazgos no son patognomónicos y para establecer un diagnóstico inequívoco resulta imprescindible la realización de un *inmunoblot* o incluso técnicas más complejas, como la inmunoprecipitación^{2,5,7}.

Respecto al tratamiento, se siguen las pautas propuestas para el PA: corticoides tópicos potentes, prednisona 0,5 mg/kg en monoterapia o en combinación con dapsona

(1,5 mg/kg)^{2,5,15}. La evolución del cuadro es variable, pero en general suele responder de forma rápida y favorable a los inmunosupresores^{2,5}.

En conclusión, presentamos los 2 primeros casos de penfigoide anti-p200 descritos en nuestro país caracterizados clínica, patológica e inmunológicamente. Dadas las dificultades técnicas que plantea su diagnóstico parece probable que el penfigoide anti-p200 esté infradiagnosticado, habiendo casos erróneamente clasificados como PA o EAA. La diferenciación con esta última resulta especialmente importante, ya que ambas entidades presentan diferencias significativas respecto al manejo terapéutico y al pronóstico. Proponemos la inmunohistoquímica con colágeno IV sobre piel lesional, combinándola con las técnicas habituales de IF, como una herramienta sencilla y accesible para el diagnóstico diferencial con la EAA.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este estudio ha sido parcialmente financiado con cargo al proyecto de investigación PI 09/1410 del ISCIII (a J. Herrero), con cofinanciación del FEDER.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Dra. María Teresa Fernández Figueras y al Dr. Josep Palou Aymerich, por su valiosa colaboración cediéndonos los bloques de parafina de los pacientes para la realización de nuevos cortes, posibilitando la realización del estudio inmunohistoquímico con colágeno IV.

Bibliografía

- Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, et al. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol.* 1996;106:1333–8.
- Goletz S, Hshimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Anti-p200 pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71:185–91.
- Ishii N, Yoshida M, Hisamatsu Y, Ishida-Yamamoto A, Nakane H, Iizuka H, et al. Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: Study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol.* 2004;150:843–51.
- Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Delaporte E, D'Incan M, Dreno B, et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: A multicenter randomized study. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1681–7.
- Dilling A, Rose C, Hashimoto T, Zillikens D, Shimanovich I. Anti-p200 pemphigoid: A novel autoimmune subepidermal blistering disease. *J Dermatol.* 2007;34:1–8.
- Kawahara Y, Zillikens D, Yancey KB, Marinkovich MP, Nie Z, Hashimoto T, et al. Subepidermal blistering disease with autoantibodies against a novel dermal 200-KDa antigen. *J Dermatol Sci.* 2000;23:93–102.
- Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, et al. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol.* 2010;37:231–8.
- Wozniak K, Kowalewski C, Hashimoto T, Ishii N, Glinska-wielochowska M, Schwartz RA. Penicillin-induced anti-p200 pemphigoid: An unusual morphology. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:443–6.
- Rose C, Weyers W, Denisjuk N, Hillen U, Zillikens D, Shimanovich I. Histopathology of anti-p200 pemphigoid. *Am J Dermatopathol.* 2007;29:119–24.
- Monshi B, Groth S, Richter L, Schmidt E, Zillikens D, Rappersberger K. A long-term study of a patient with anti-p200 pemphigoid: Correlation of autoantibody levels with disease activity and an example of epitope spreading. *Br J Dermatol.* 2012;167:1179–83.
- Dainichi T, Kurono S, Ohyama B, Ishii N, Sanzen N, Hayashi M, et al. Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:2800–5.
- Vafia K, Stephanie G, Beckmann T, Hirose M, Dworschak J, Recke A, et al. Pathogenicity of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *PLoS One.* 2012;7:1–11.
- Florea F, Bernards C, Caproni M, Kleindienst J, Hashimoto T, Koch M, et al. Ex vivo pathogenicity of anti-laminin (1 autoantibodies). *Am J Pathol.* 2014;184:494–505.
- Koga H, Ishii N, Dainichi T, Tsuruta D, Hamada T, Ohata C, et al. An attempt to develop mouse model for anti-laminin (1 pemphigoid). *J Dermatol Sci.* 2013;70:108–15.
- Suárez-Fernández R, España-Alonso A, Herrero-González JE, Mascaró-Galy JM. Manejo práctico de las enfermedades ampollas autoinmunes más frecuentes. *Actas Dermosifiliogr.* 2008;99:441–55.