

## Métodos diagnósticos en las enfermedades ampollasas subepidérmicas autoinmunes

Minia Campos Domínguez, Ricardo Suárez Fernández y Pablo Lázaro Ochaita

Unidad de Enfermedades Ampollasas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

**Resumen.**—Dentro de las enfermedades ampollasas subepidérmicas autoinmunes (EASA) existe un gran solapamiento clínico e histológico entre distintas entidades. El conocimiento molecular de la unión dermoepidérmica es básico para comprender este grupo de patologías. Las técnicas de base inmunológica han contribuido a aumentar el conocimiento sobre estas enfermedades y se han ido incorporando progresivamente a la práctica clínica. En esta revisión sobre los métodos diagnósticos de las EASA revisamos los avances más recientes en la biología molecular de la unión dermoepidérmica y nos centramos principalmente en los métodos diagnósticos inmunológicos. Distinguimos dos grandes grupos: los que detectan depósitos autoinmunes en piel (inmunofluorescencia directa y sus variantes incluyendo la aplicación de la microscopía confocal) y los que detectan anticuerpos en suero u otros fluidos (inmunofluorescencia indirecta y variantes, ELISA, *immunoblot* e inmunoprecipitación). Dentro de las técnicas más difundidas en nuestro medio exponemos la metodología y las claves diagnósticas.

**Palabras clave:** enfermedades ampollasas subepidérmicas autoinmunes, métodos diagnósticos, ampollas.

### DIAGNOSTIC METHODS IN AUTOIMMUNE SUBEPIDERMAL BULLOUS DISEASES

**Abstract.**—There is considerable clinical and histological overlap among the subepidermal autoimmune bullous diseases. The knowledge at the molecular level of the dermo-epidermal junction is essential to understand this group of diseases. The immune-based techniques have contributed to increase the knowledge of these entities and have been progressively incorporated into clinical practice. In this review of the diagnostic methods of subepidermal autoimmune bullous diseases we summarize the most recent advances on the molecular biology of the dermo-epidermal junction, focusing on the immune-based diagnostic techniques. We distinguish two main groups of diagnostic methods: those that detect autoimmune deposits in the skin (direct immunofluorescence and its variants including confocal microscopy) and those that detect antibodies in serum or in other fluids (indirect immunofluorescence and its variants, ELISA, immunoblot and immunoprecipitation). We explain the methodology and diagnostic keys of the techniques most widely applied in our milieu.

**Key words:** subepidermal autoimmune bullous diseases, diagnostic methods, blisters.

### INTRODUCCIÓN

#### Las enfermedades ampollasas subepidérmicas autoinmunes

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 (fig. 1). El ataque autoinmune contra la unión dermoepidérmica desencadena un grupo de enfermedades denominadas enfermedades ampollasas subepidérmicas autoinmunes (EASA)<sup>1,2</sup>. 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 molé-

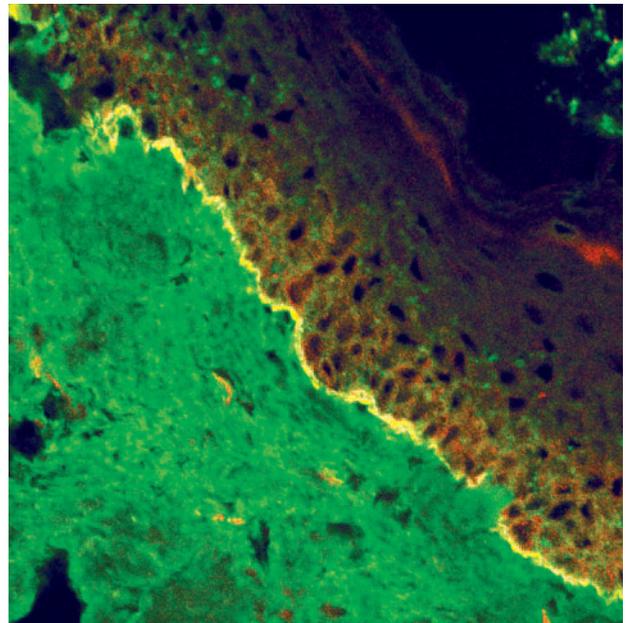


Fig. 1.—Imagen de microscopía confocal de la unión dermoepidérmica.

Correspondencia:  
Minia Campos Domínguez.  
Dr. Esquerdo, 46. 28007 Madrid. España.  
miniacampos@gmail.com

Recibido el 21 de agosto de 2006.  
Aceptado el 4 de septiembre de 2006.

**TABLA 1.** ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES

<i>Enfermedad</i>	<i>Principales antígenos implicados</i>	<i>Localización de antígenos en piel separada</i>
Penfigoide ampolloso	Colágeno XVII BP230	Lado epidérmico Lado epidérmico
Penfigoide gestacional	Colágeno XVII BP230	Lado epidérmico Lado epidérmico
Penfigoide anti-p200	Proteína de 200 kDa	Lado dérmico
Liquen plano penfigoide	Colágeno XVII	Lado epidérmico
Penfigoide de mucosas	Colágeno XVII BP230	Lado epidérmico Lado epidérmico
• Penfigoide antiepiligrina	Integrina $\alpha 6\beta 4$ Laminina 5	Lado epidérmico Lado dérmico
Epidermolisis ampollosa adquirida	Colágeno VII	Lado dérmico
Dermatitis herpetiforme	Transglutaminasa epidérmica	
Dermatosis IgA lineal	Colágeno XVII LAD-1 BP230 Colágeno VII	Lado epidérmico Lado epidérmico Lado epidérmico
Lupus eritematoso ampolloso	Colágeno VII	Lado dérmico

culas de adhesión, con la subsiguiente formación de ampollas subepidérmicas y lesiones secundarias<sup>3</sup>.

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, epidermolisis 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.

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<sup>4,5</sup>. Hay superposiciones clínico-inmunológicas y exclusivamente inmunológicas. Un ejemplo de esto último es una serie de casos de la literatura con clínica de penfigoide ampolloso y clara reactividad frente a colágeno XVII y desmogleína 3 sin las lesiones en mucosas características del pénfigo vulgar<sup>6-13</sup>.

Las superposiciones se atribuyen en muchos casos a la expansión de epítomos, un proceso por el cual, de-

bido al daño tisular por un proceso antiinflamatorio autoinmune, la exposición de un antígeno previamente «secuestrado» conduce a una respuesta autoinmune secundaria frente a este antígeno<sup>14</sup>.

Los métodos diagnósticos en las EASA tienen 3 objetivos:

1. Distinguir las EASA de otros grupos de enfermedades vesiculoampollosas:
  - a) Enfermedades ampollosas hereditarias.
  - b) Enfermedades infecciosas (virales y bacterianas).
  - c) Otras enfermedades de mecanismo inmunológico (por ejemplo eritema exudativo multiforme, reacciones medicamentosas).
  - d) Miscelánea: porfiria cutánea tarda, bullosis diabeticorum, ampollas de origen físico y eczema 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.

#### *Estructura y proteínas principales de la unión dermoepidérmica*

La unión dermoepidérmica es una estructura altamente especializada que actúa como vehículo de comunicación entre epidermis y dermis. Hoy no se mantiene la visión estática, puramente física de la unión

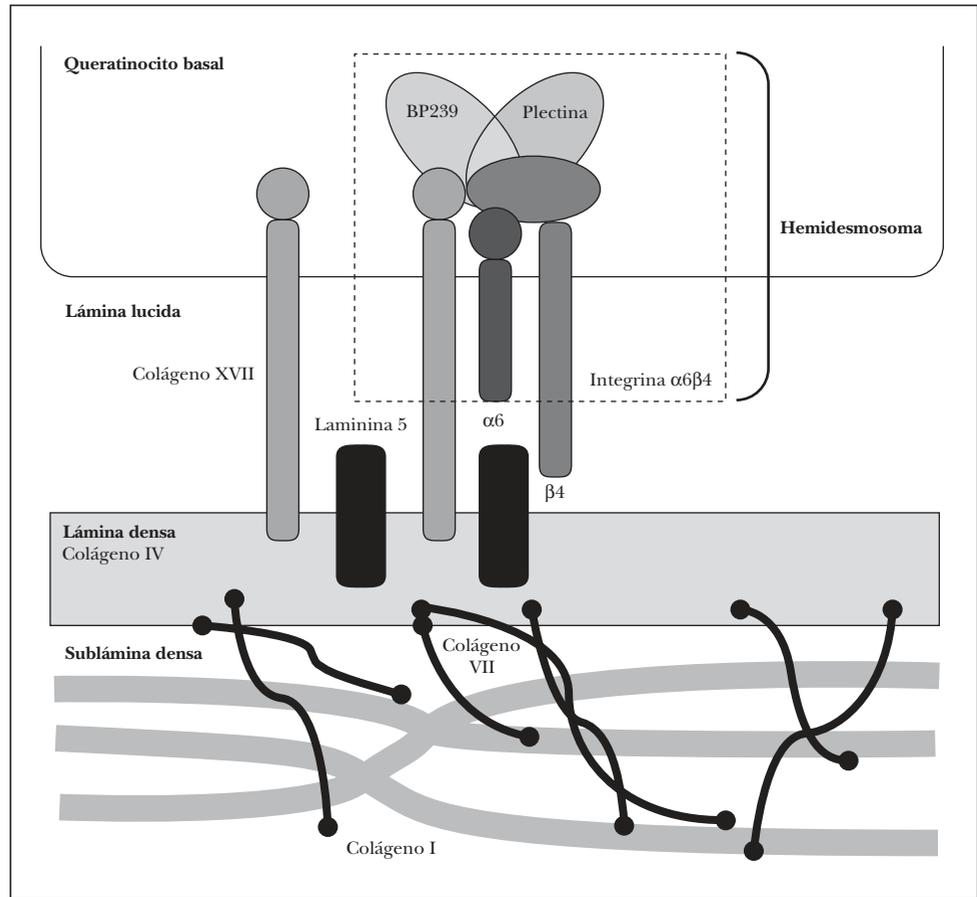


Fig. 2.—Estructuras y proteínas principales de la unión dermoepidérmica.

dermoepidérmica, sino que se considera que realiza las siguientes funciones:

1. Adhesiva: sustrato para la adhesión de los queratinocitos basales, anclaje dermoepidérmico, transmisión mecánica entre epidermis y fibras elásticas y colágenas dérmicas.
2. Barrera: regulación de la permeabilidad de macromoléculas en ambos sentidos.
3. Señalización celular: transmisión de señales de diferenciación, morfogénesis y apoptosis epidérmica, permeabilidad de células inflamatorias y 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 papilar<sup>15</sup> (fig. 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.

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 tejidos, pero en la presente revisión preferimos mantener este término por su estabilidad en la literatura<sup>16</sup>.

La interfase entre la lámina densa y la 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.

#### *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 fundamen-

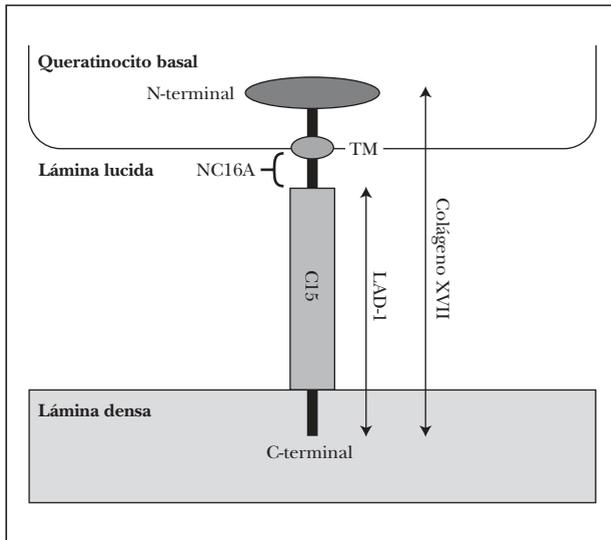


Fig. 3.—Estructura del colágeno XVII o BP180.

les 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*)<sup>2,15</sup>. Es la proteína implicada con más frecuencia en la patología autoinmune de la unión dermoepidérmica y la mejor conocida<sup>17,18</sup>.

Es una glucoproteína transmembrana (fig. 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  $\alpha 6 \beta 4$ . El extremo C-terminal se extiende a través de la lámina lucida y llega a la lámina densa<sup>19</sup>.

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 colágeno<sup>20</sup>.

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  $\alpha 6 \beta 4$ <sup>21</sup>.

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 ratón<sup>22</sup>. En la epidermolisis ampollosa juntural no Herlitz se encuentra mutado el gen del colágeno XVII.

**BP230.** Es una proteína de 230 kDa también denominada BPAG1 (*bullous pemphigoid antigen 1*)<sup>2,15</sup>. 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 ampolloso y dermatosis IgA lineal aparecen autoanticuerpos contra BP230, pero se duda de que sean patogénicos; más bien se cree que su producción se induce secundariamente a la reacción inflamatoria en la unión dermoepidérmica.

No hay mutaciones conocidas de BP230 en la patología ampollosa hereditaria.

**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 actina<sup>23</sup>.

Se han descrito algunos casos de reactividad contra plectina en patología autoinmune, sobre todo penfigoides ampollosos, pero tiene una importancia secundaria<sup>24-26</sup>.

La plectina está mutada en un tipo de epidermolisis ampollosa simple (epidermolisis ampollosa simple con distrofia muscular de cinturas).

**Integrina  $\alpha 6 \beta 4$ .** Las integrinas son glucoproteínas 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 en 2 subunidades distintas entre sí<sup>2,15</sup>. 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 y 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 subunida-

des conduce a la epidermolisis ampollosa juntural con atresia pilórica.

### Lámina densa

La lámina densa se compone principalmente de colágeno IV, lamininas 5, 6 y 10 y proteoglicanos.

**Colágeno IV.** Es un heterotrímero formado a partir de 6 genes diferentes, de los cuales en la piel se expresan COL4A1 (subunidad  $\alpha 1$  [IV]), COL4A2 (subunidad  $\alpha 2$  [IV]), COL4A6 (subunidad  $\alpha 6$  [IV]), COL4A5 (subunidad  $\alpha 5$  [IV])<sup>2</sup>. En común con otros colágenos tiene un largo dominio triple hélice tipo colágeno; posee 2 dominios no colágenos globulares en los extremos C-terminal (NC1) y N-terminal (NC2) que permiten el ensamblaje con la propiedad de crear redes colágenas planas.

El dominio NC1 de  $\alpha 3$ (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  $\alpha 5$ (IV).

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

**Laminina 5.** Las lamininas son una familia de glucoproteínas heterotriméricas que cumplen funciones estructurales y de señalización. Cada laminina está formada por tres subunidades ( $\alpha, \beta, \gamma$ )<sup>2,15</sup>. La laminina 5 ( $\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$ ) 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 5 se conoce también como epiligrina, y un tipo de penfigoide de mucosas con autoinmunidad contra laminina 5 se denominaba penfigoide anti-epiligrina<sup>27-29</sup>. La mayoría de los pacientes con penfigoide de mucosas y autoinmunidad contra laminina 5 reconocen la subunidad  $\alpha 3$ <sup>30</sup>.

### Sublámina densa

Las fibrillas de anclaje son unas estructuras arci-formes observables mediante microscopía electróni-

ca, que se componen fundamentalmente de colágeno VII<sup>31</sup>.

**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 epítotos inmunodominantes. En el extremo C-terminal se sitúa el dominio NC2<sup>2,15,32-34</sup>.

Es el antígeno implicado en la epidermolisis ampollosa adquirida, el lupus eritematoso sistémico ampoloso y algunos casos de dermatosis IgA lineal<sup>35-37</sup>.

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

## MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

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

### Métodos diagnósticos sin detección de autoanticuerpos

#### Histopatología convencional

La biopsia convencional fijada en formol es un punto de partida imprescindible en el diagnóstico histopatológico<sup>2,38</sup>. La elección del lugar de biopsia es muy importante (fig. 4). Debe estudiarse el borde de la ampolla o vesícula para observar el lugar de despegamiento bajo el microscopio. La presencia de un infiltrado rico en eosinófilos, neutrófilos o pobre en células inflamatorias es orientativa pero nunca diagnóstica (fig. 5).

#### 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 ésta con



Fig. 4.—Lugares recomendados para la realización de biopsias para estudio convencional (negro) y para inmunofluorescencia (rojo).

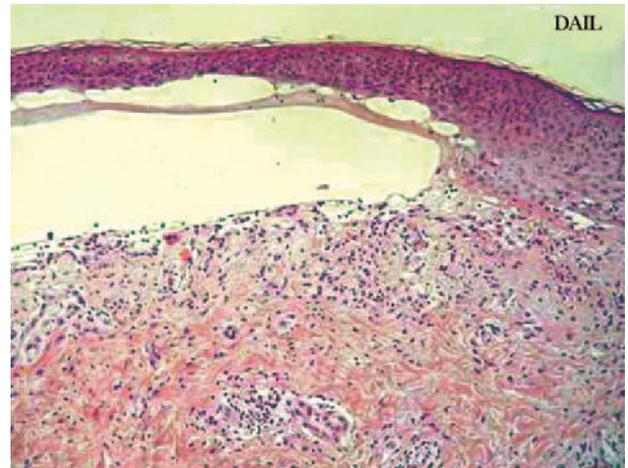
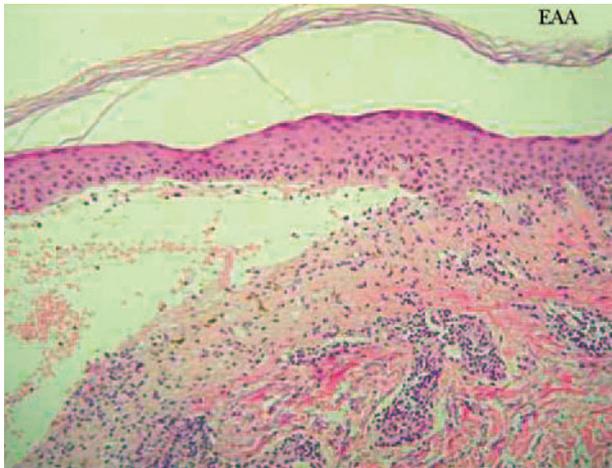


Fig. 5.—Tinción con hematoxilina-eosina de una epidermolisis ampollas adquirida (EAA) y una dermatosis IgA lineal (DAIL). En ambas se observa un despegamiento subepidérmico y un infiltrado inflamatorio moderado con neutrófilos. La histopatología convencional no distingue unas enfermedades ampollas subepidérmicas de otras.

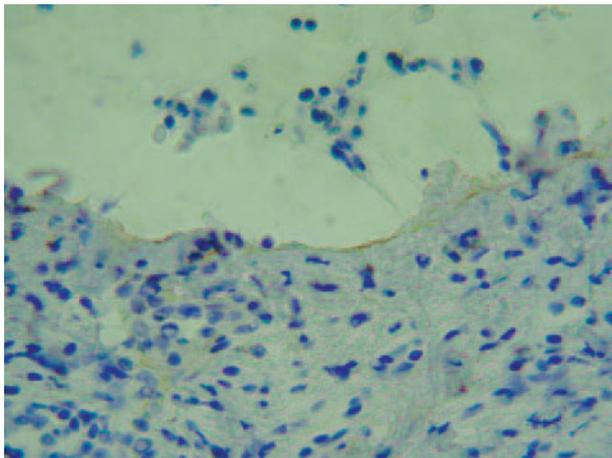


Fig. 6.—Tinción inmunohistoquímica para colágeno IV, que se observa de coloración parda en el suelo del despegamiento patológico en un caso de penfigoide ampollas.

respecto al despegamiento patológico. 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 (fig. 6)<sup>2</sup>.

#### *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 investigación<sup>38</sup>.

#### **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.

#### *Detección de depósitos autoinmunes en piel*

##### *Inmunofluorescencia directa*

Su objetivo es detectar depósitos de inmunoglobulinas o complemento en la unión dermoepidérmica<sup>2,38-42</sup>.

##### *IFD convencional*

1. Toma de la biopsia. La elección del lugar de la biopsia para inmunofluorescencia directa es clave para la rentabilidad diagnóstica<sup>40,43</sup>. 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 ampollas y en la epidermolisis ampollas 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 estándar 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 (fig. 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 ampolloso<sup>44</sup>.

En el penfigoide de mucosas hay que elegir las áreas menos traumáticas para biopsiar. Si hay lesiones en piel deben ser éstas las que se biopsien. Si hay lesiones orales y oculares deben elegirse las primeras. Si sólo hay lesiones oculares hay que valorar el beneficio-riesgo de la realización de la biopsia, dado que ésta puede inducir inflamación y cambios cicatriciales.

2. 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 sólo no altera la muestra, sino que además limpia la fluorescencia residual por extravasación en dermis y depósito inespecífico<sup>45,46</sup>.

En el ámbito 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<sup>47-50</sup>.

Hay comunicaciones aisladas de buena conservación de biopsias en medios como la miel<sup>51</sup>.

3. 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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 verde<sup>41</sup>.

La clave de la inmunofluorescencia es la utilización de anticuerpos de especies no humanas conjugados con un fluorocromo y específicos contra in-

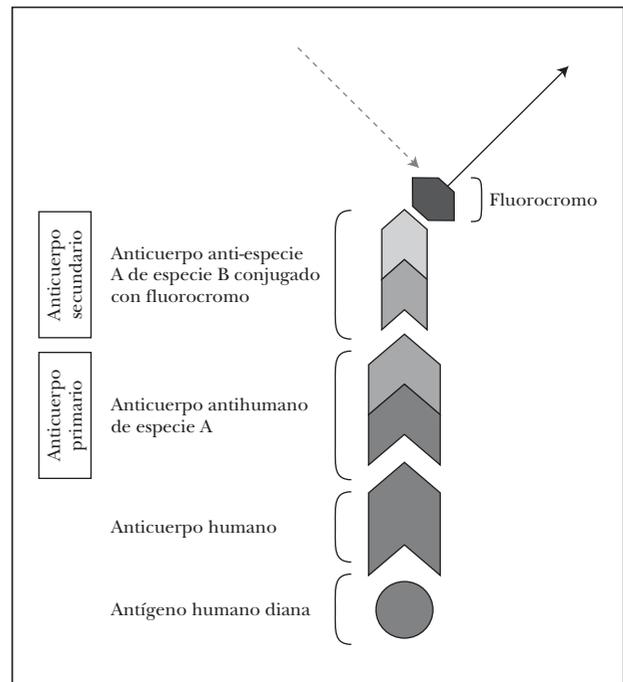


Fig. 7.—Fundamento de la inmunofluorescencia. Técnica de marcaje indirecto para inmunofluorescencia directa.

munoglobulinas o complemento humano. Describimos a continuación las técnicas de marcaje directo e indirecto.

En la técnica directa, la más utilizada de forma rutinaria, se utiliza un anticuerpo primario antiinmunoglobulina humana (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) o anticomplemento humano (anti-C3) de origen animal y conjugado generalmente con FITC.

El marcaje indirecto utiliza dos anticuerpos: primario y secundario. En el estudio de enfermedades ampollas el anticuerpo primario es una IgG antiinmunoglobulina humana o anticomplemento humano generado en una especie no humana (ratón, cabra, conejo y otros). El anticuerpo secundario en una anti-IgG murina, anti-IgG caprina o lo que corresponda según el animal de origen, que sólo 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  $\lambda$  que estimula este fluorocromo (fig. 7). La técnica de marcaje indirecto aumenta la sensibilidad, pero reduce la especificidad al incrementar la tinción inespecífica.

4. 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.

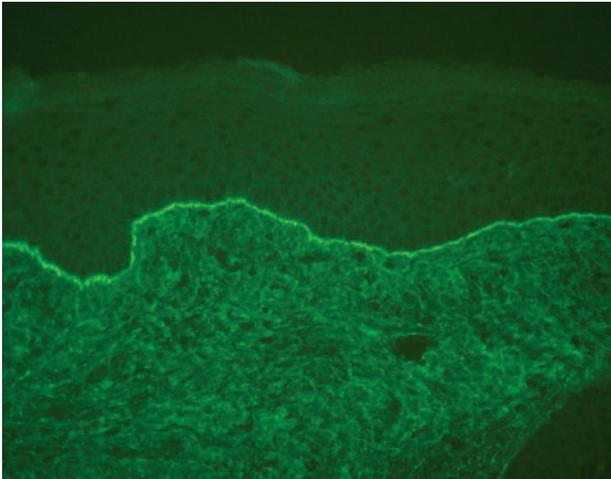


Fig. 8.—Depósito lineal de IgG en penfigoide ampolloso.

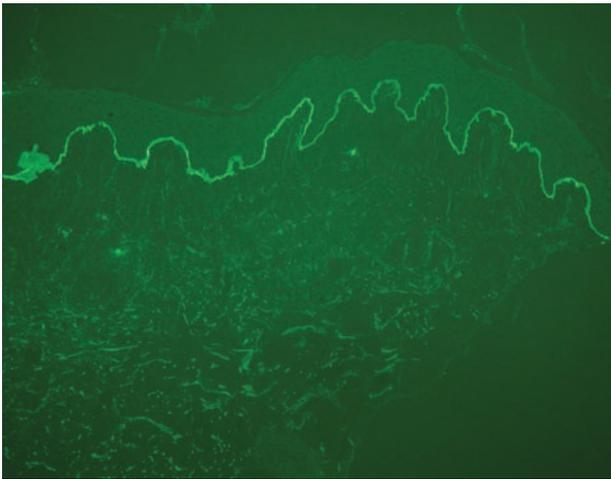


Fig. 9.—Depósito lineal de IgA en dermatosis IgA lineal.

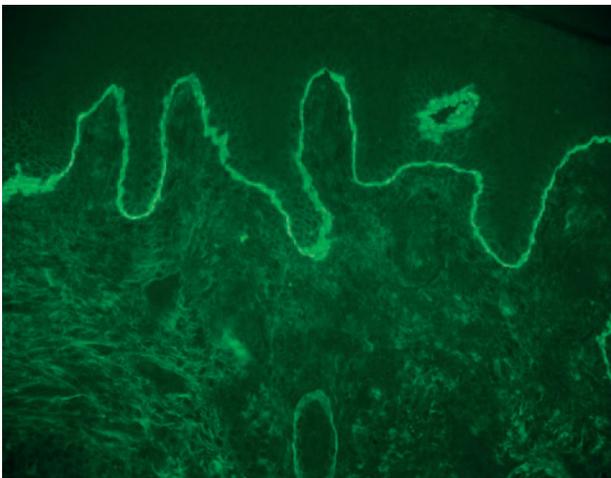


Fig. 10.—Intenso depósito de C3 en penfigoide ampolloso.

En las enfermedades ampollas 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 puntos<sup>38-41</sup>: *a*) tipo de depósito autoinmune: IgG, IgA, IgM, complemento; *b*) existencia de uno o varios tipos de depósitos; *c*) patrón de fluorescencia: fundamentalmente lineal o granular, y *c*) 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 ampolloso, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas, penfigoide anti-p200, dermatosis IgA lineal, epidermolisis ampollas adquirida y lupus eritematoso ampollas, o lo que es lo mismo, en todas las EASA 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 se pueden confundir con vasos.

*Depósitos únicos en la membrana basal.*

*IgG y/o C3.* Se ven en el penfigoide ampolloso, penfigoide de mucosas, penfigoide gestacional, liquen plano penfigoide, penfigoide anti-p200, epidermolisis ampollas adquirida y lupus eritematoso ampollas (fig. 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 epidermolisis ampollas adquiridas (EAA) y lupus eritematoso ampollas (LEA).

Vodegel et al<sup>52</sup> 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 ampollas, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas, penfigoide anti-p200, y 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.

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

*C3:* como ya se ha mencionado, un depósito único de C3 puede verse en penfigoide ampollas, penfigoide gestacional, penfigoide de mucosas y liquen plano penfigoide (fig. 10).

*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.

*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 (fig. 11).

5. 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 sólo el 28 %. Por tanto, es muy recomendable fotografiar los resultados y almacenarlos digitalmente<sup>53</sup>.

*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 dérmico<sup>54</sup> (tabla 1).

El método que más se ha extendido es la separación mediante NaCl 1M. La biopsia se incuba de 48 a 72 horas en NaCl 1M, a 4 °C y posteriormente se realiza la tinción habitual de inmunofluorescencia directa<sup>55-57</sup>.

En general en el penfigoide ampolloso, penfigoide gestacional y penfigoide de mucosas los depósitos se ven en el lado epidérmico, convencionalmente superior o «techo» de la hendidura artificial (fig. 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-epiligrina o anti-laminina 5 los depósitos están en el lado dérmico.

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 (fig. 13).

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.

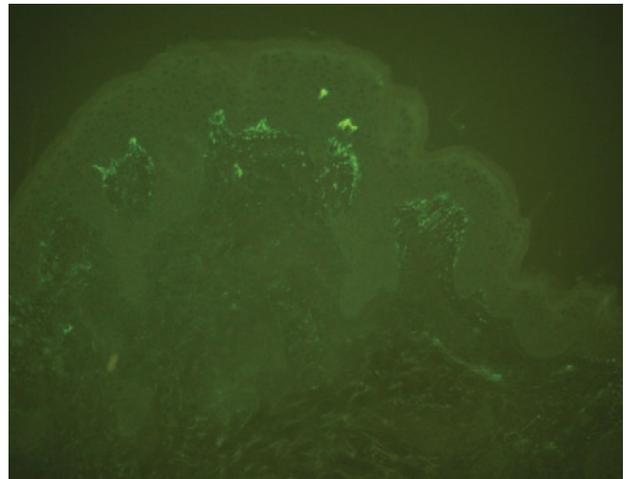


Fig. 11.—Depósito granular de IgA en dermatitis herpetiforme.

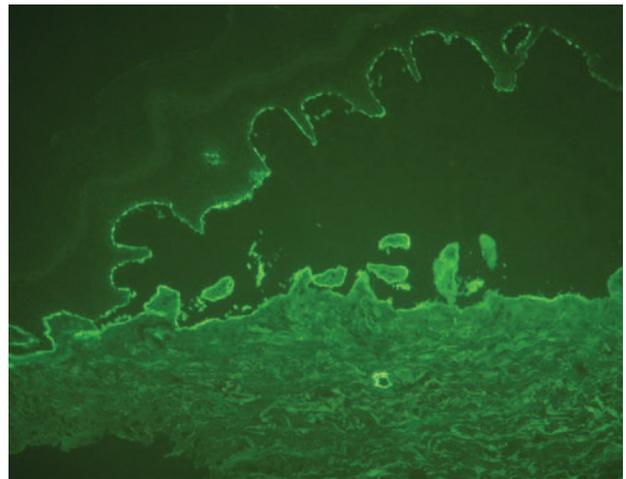


Fig. 12.—Inmunofluorescencia directa de piel separada en NaCl 1M: depósito en el lado epidérmico de separación en penfigoide ampolloso.

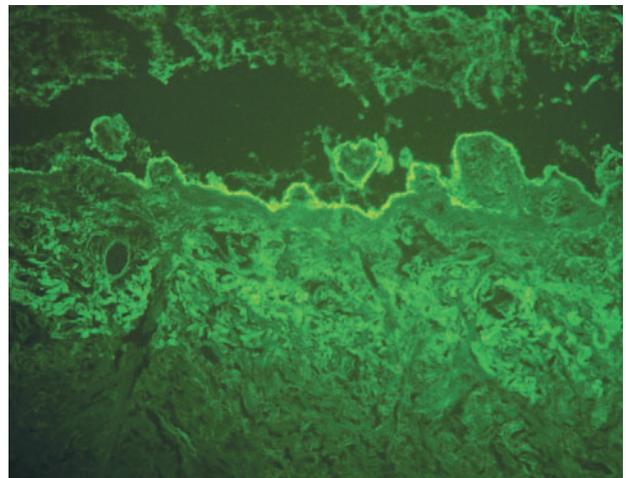


Fig. 13.—Inmunofluorescencia directa de piel separada en NaCl 1M: depósito en el lado dérmico de separación en epidermolisis ampollosa adquirida.

**TABLA 2. PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS ENFERMEDADES AMPOLLOSAS SUBEPIDÉRMICAS AUTOINMUNES**

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 antiepiligrina	Lineal Membrana basal	IgG y/o IgA y/o C3	Epidérmico o ambos lados Dérmico
Epidermolisis ampollosa adquirida	Lineal Membrana basal	IgG ± IgA ± C3	Dérmico
Dermatitis herpetiforme	Granular en papilas dérmicas y membrana basal	IgA	
Dermatitis IgA lineal	Lineal Membrana basal	IgA ± C3	Epidérmico Algunos casos dérmico
Lupus eritematoso ampolloso	Lineal o granular Membrana basal	IgG ± IgA ± C3	Dérmico

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

*Inmunofluorescencia directa mediante microscopía confocal.* El término «confocal» designa un sistema óptico común a dispositivos muy distintos (microscopía convencional, microscopía de inmunofluorescencia y microscopía in vivo) que permite eliminar los artefactos por superposición al permitir el paso de la luz reflejada desde un único plano y eliminar la procedente de puntos fuera de foco. El efecto puede compararse al de un microtomo óptico<sup>58-62</sup>.

El microscopio confocal espectral es un microscopio de fluorescencia sofisticado. En lugar de observar directamente a través de los oculares, un software procesa las imágenes y realiza reconstrucciones. En enfermedades ampollas realiza cortes que permiten estudios de alta resolución de la morfología de los depósitos. El software permite analizar dos o más fluorocromos simultáneamente, realizar superposiciones de imágenes y visualizar el área de colocalización de proteínas seleccionadas. La colocalización de proteínas y anticuerpos puede visualizarse e incluso realizar un análisis numérico.

En el diagnóstico de enfermedades ampollas mediante microscopía confocal se realiza una técnica denominada FOAM<sup>63-71</sup> (*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 tinción. Las proteínas marcadoras elegidas con mayor frecuencia son el colágeno VII, colágeno IV, laminina y subunidad  $\beta 4$  de integrina  $\alpha 6\beta 4$  (fig. 14).

#### *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<sup>38,72</sup>.

En penfigoide ampolloso 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.

#### **Detección de autoanticuerpos en suero**

Los autoanticuerpos contra las proteínas de la unión dermoepidérmica no se encuentran sólo en la piel. También es posible detectarlos en suero y orina<sup>73</sup>. Se han desarrollado distintas técnicas para la detección y clasificación de estos autoanticuerpos que detallamos a continuación.

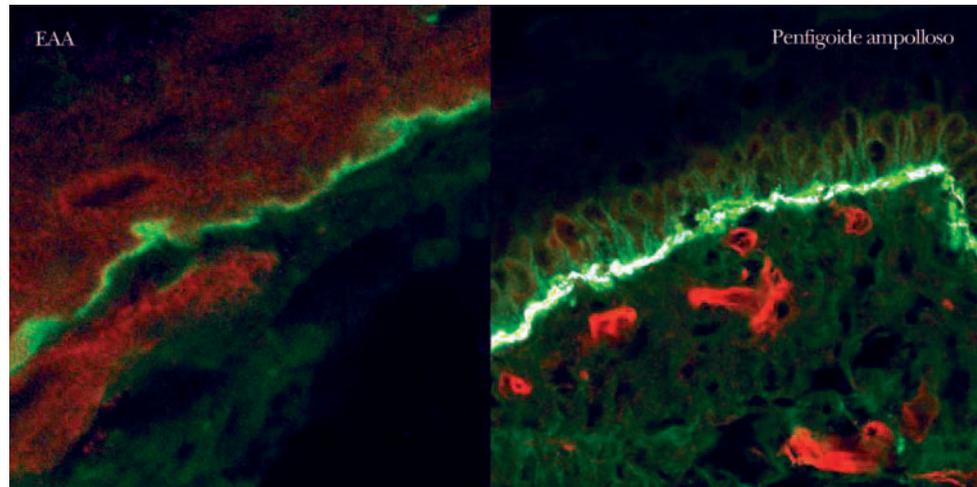


Fig. 14.—FOAM (*fluorescent overlay antigen mapping*) mediante microscopía confocal. Estudio de colocalización de  $\beta 4$  integrina con depósitos autoinmunes. En epidermolisis ampollosa adquirida (EAA) se observa una nítida banda verde de IgG situada inferior a la integrina (roja) en consonancia 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.

### Immunofluorescencia 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<sup>38,41,74,75</sup>. Se han usado como sustratos piel humana normal y 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 indirecta y se interpretan siguiendo los mismos criterios.

*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 antiinmunoglobulina humana marcada con un fluorocromo.

En una variante, poco usada, se incuba el sustrato-suero con complemento, y después con anti-C3 humano.

1. Depósitos de IgG. Se encuentran anticuerpos IgG anti-membrana basal en penfigoide ampolloso, penfigoide de mucosas, penfigoide gestacional, EAA y LEA, con prevalencia variable. En penfigoide gestacional sólo es positivo 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 EAA. En el LEA sólo 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 ampolloso.

2. Depósitos de IgA. Se encuentran IgA anti-membrana basal en la dermatosis ampollosa 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 ampolloso pueden detectarse IgA, siempre con IgG.

*Inmunofluorescencia indirecta sobre piel separada.* Una variante de inmunofluorescencia indirecta consiste en separar la piel sana en NaCl 1M, como en la IFD<sup>41,76-80</sup>. 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 epidermolisis ampollosa adquirida, penfigoide de mucosas antiepiligrina, penfigoide anti-p200 y LEA la fluorescencia se localiza en el suelo de la hendidura. En dermatosis IgA lineal puede aparecer fluorescencia en cualquiera de los dos lados.

*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<sup>5,81</sup>.

*Microscopía inmunoelectrónica 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 lamina 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.

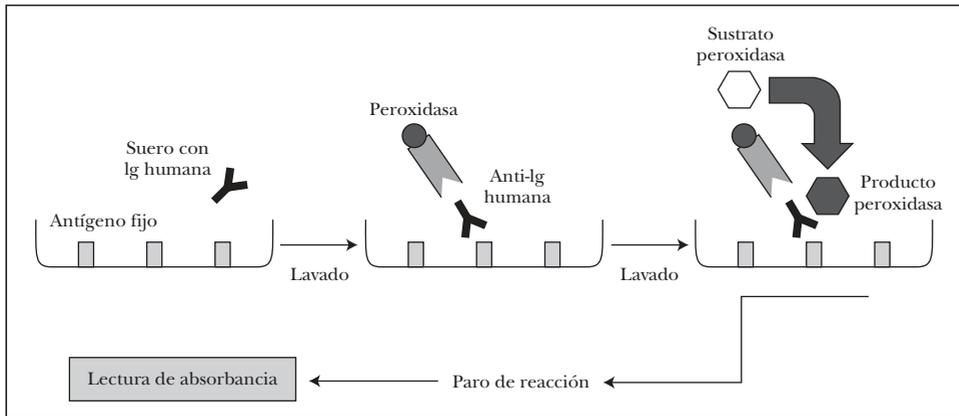


Fig. 15.—Técnica del ELISA indirecto.

### 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<sup>82</sup>. Para detectar autoanticuerpos se emplea el ELISA indirecto, en el que los pocillos tienen el antígeno fijo. La técnica se observa en la figura 15 y se puede resumir en los siguientes pasos<sup>82,83</sup>.

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 cuantificar.

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.

Existen varios *kits* comerciales. El más utilizado detecta anticuerpos contra el segmento NC16A del colágeno XVII. En la fase sólida de los pocillos hay NC16A de origen recombinante. En penfigoide ampollado el ELISA contra NC16A tiene una sensibilidad del 94 % y especificidad del 97 %. En penfigoide gestacional la sensibilidad se acerca al 100 %. En cambio, el ELISA frente al colágeno XVII completo (también comercializado) sólo es positivo en el 66,6 % de los pacientes<sup>84-89</sup>.

Se ha demostrado correlación de los títulos de anticuerpos contra NC16A con la actividad de la enfermedad y la respuesta terapéutica, 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<sup>90-94</sup>.

Hay un ELISA para el dominio NC1 del colágeno VII, pero todavía no es comercial. Ha demostrado ser sensible y específico para EAA y LEA.

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

### Immunoblot

El término blot (mancha, borrón) se aplica a 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 ADN, el *northern blot* analiza ARN y el *western blot* analiza proteínas<sup>95</sup>. Lo que se conoce como *immunoblot* es un tipo de *western blot* en el que tras separar extractos proteicos de un tejido determinado, éstos se incuban con un suero problema que contiene potenciales autoanticuerpos<sup>83,96,97</sup>.

El objetivo del *immunoblot* en la patología ampollada 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.

**TABLA 3.** COMPARACIÓN DE *INMUNOBLOT*, INMUNOPRECIPITACIÓN Y ELISA

	<i>Inmunoblot</i>	<i>Inmunoprecipitación</i>	<i>ELISA</i>
Detergentes utilizados	Fuertes	Suaves	No precisa
Desnaturalización de proteínas	Sí	No	No
Epítomos conformacionales	No	Sí	Sí
Separación subunidades proteicas	Sí	No	Sí
Rápida	No	No	Sí

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 de uso más extendido 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  $^{125}\text{I}$  y autorradiografía.

Los extractos dérmicos contienen el colágeno VII, sus fragmentos y el antígeno de 200 kDa identificado en el penfigoide anti-p200<sup>97-105</sup>. Interesan para estudiar la epidermolisis ampollosa adquirida, LEA, algunos casos de dermatosis IgA lineal y el penfigoide anti-p200. Los extractos epidérmicos son útiles para el resto de enfermedades.

En penfigoide ampolloso el *inmunoblot* reconoce dos 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 5 (epiligrina) y laminina 6<sup>106,107</sup>.

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 EAA 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 confor-

macionales. Esto hace bajar la sensibilidad de la técnica y aumenta el número de falsos negativos.

### 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 investigación<sup>83</sup>. Exige solubilizar cada proteína por separado y detectar, también 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 penfigoide antiépiligrina para la detección de autoanticuerpos contra la laminina 5.

En la tabla 3 se resumen las ventajas y desventajas de las técnicas de *inmunoblot*, inmunoprecipitación y ELISA.

### PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO

En la figura 16 mostramos el protocolo ideal de diagnóstico de las EASA<sup>3</sup>. Es obvio que en la práctica clínica habitual de nuestro medio no son realizables muchas de las pruebas, que deben enviarse a centros de referencia nacionales e incluso internacionales. Es muy importante la colaboración interdisciplinar con los Servicios de Inmunología y Anatomía Patológica, e incluso la creación de Unidades de Enfermedades Ampollosas. Previsiblemente la técnica que presentará un mayor crecimiento en los próximos años será el ELISA, con la aparición de nuevos *kits* comerciales contra más antígenos de los ahora disponibles.

### IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS RESULTADOS DIAGNÓSTICOS

La importancia del diagnóstico preciso de las EASA reside en el diferente pronóstico que tienen las distintas enfermedades y su diferente abordaje terapéuti-

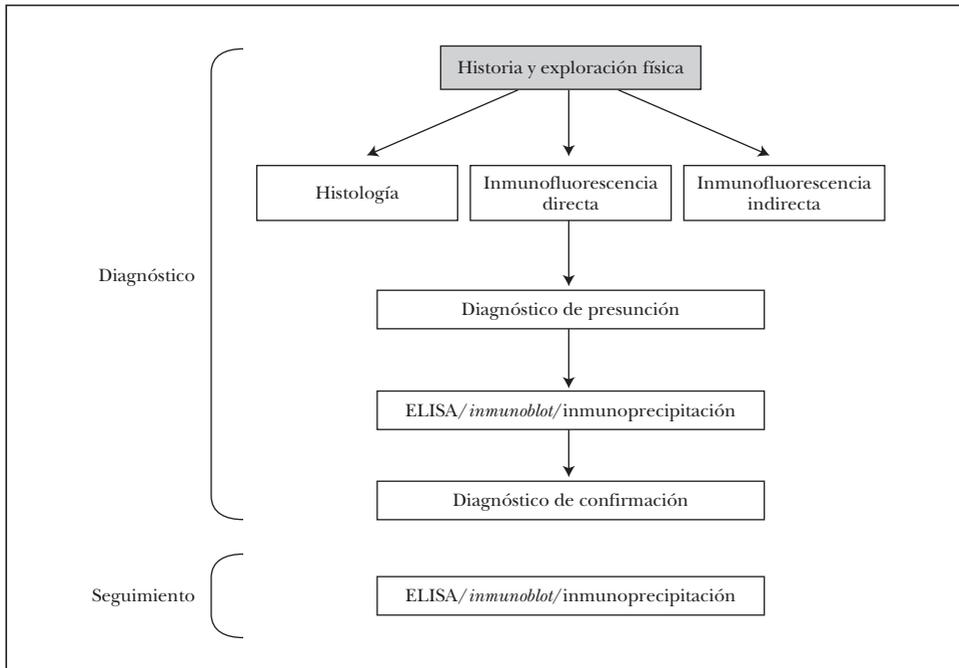


Fig. 16.—Protocolo diagnóstico de las enfermedades ampollosas subepidérmicas autoinmunes.

co. Por ejemplo, la EAA tiene una característica resistencia a los corticoides orales que la diferencia del penfigoide ampoloso, enfermedad con inmunofluorescencia directa casi idéntica.

Aunque todavía no muy generalizado, el control de la actividad de la enfermedad de las EASA mediante ELISA permitirá un mejor ajuste de la medicación inmunosupresora y el tratamiento precoz de los rebrotes.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Manuel Lecona las imágenes histopatológicas y de inmunofluorescencia. Las imágenes de microscopía confocal han sido realizadas en la Unidad de Microscopía Confocal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, coordinada por la Dra. Paloma Sánchez-Mateos. Las tinciones para microscopía confocal han sido realizadas por Isabel Treviño y la obtención de las imágenes ha sido posible gracias a Rafael Samaniego.

## GLOSARIO

**Confocal:** adjetivo que se aplica a sistemas ópticos diversos que tienen en común el paso de la luz emitida por la muestra a través de un sólo punto, de forma que sólo se analiza la correspondiente a un plano determinado.

**Dominio:** parte de una proteína con estructura terciaria característica que en muchos casos determina una función o ligando.

**Epítipo:** conjunto de aminoácidos reconocido por un determinado anticuerpo determinado dentro de un dominio de una proteína.

**Epítipo conformacional:** conjunto de aminoácidos que son reconocidos por un determinado anticuerpo gracias a que la estructura terciaria de la proteína los sitúa en una organización tridimensional determinada.

**Extremos C-terminal y N-terminal:** toda proteína se forma por la unión de aminoácidos entre sí a través de sus grupos carboxilo y amino. Existen dos aminoácidos en los extremos de la cadena, uno con un grupo carboxilo libre (extremo C-terminal o carboxi-terminal) y otro con un grupo amino libre (extremo N-terminal o amino-terminal).

**Fluorocromo:** molécula que tiene la capacidad de emitir luz tras recibir el estímulo de luz de una longitud de onda determinada.

**Glucoproteína:** proteína por modificación enzimática que tiene unidos al núcleo polipeptídico residuos hidrocarbonados que intervienen en funciones de reconocimiento y adhesión.

**Heterodímero:** proteína formada por dos subunidades diferentes entre sí, normalmente provenientes de distintos genes.

**Heterotrímero:** proteína formada por 3 subunidades de las que al menos 2 son químicamente diferentes.

**Homotrímero:** molécula formada por tres subunidades de estructura química idéntica.

**Inmunoblot:** tipo de *western blot* encaminado a la detección de anticuerpos.

**kDa (kilodalton):** unidad de masa molecular equivalente a 1.000 dalton; 1 dalton es 1/12 de la masa de un

átomo de carbono 12 y es aproximadamente la masa de un átomo de hidrógeno ( $1.660\ 538\ 86\ (28) \times 10^{-27}$  kg).

Polipéptido: cadena de aminoácidos.

Membrana basal: tipo de matriz extracelular especializada que separa todos los epitelios del tejido conectivo subyacente.

Membrana plasmática basal: parte de la membrana plasmática de una célula de cualquier epitelio que se sitúa en el lado de la membrana basal, opuesto a la luz.

Secuencias tipo colágeno: las proteínas de la familia del colágeno se caracterizan por la repetición de los tripletes Gly-X-Y. La glicina es un aminoácido con un radical hidrófobo que confiere al colágeno la propiedad de ensamblarse formando tripletes hélices.

Subunidad: dentro de una proteína, cada una de las cadenas polipeptídicas que, asociadas entre sí, conforman su estructura cuaternaria.

Porción transmembrana: conjunto de aminoácidos de una proteína destinados a atravesar la membrana plasmática y conectar los fragmentos intracelulares y extracelulares.

#### Declaración de conflicto de intereses

Declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. Enfermedades ampollas. Madrid: Aula Médica; 2004.
- Megahed M. Histopathology of blistering diseases. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg; 2004.
- Eming R, Hertl M. Autoimmune bullous disorders. Clin Chem Lab Med. 2006;44:144-9.
- 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.
- Vodegel RM, Kiss M, De Jong MC, Pas HH, Altmayer A, Molnar K, et al. 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.
- 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.
- Hashimoto T, Watanabe K, Ishiko A, et al. A case of bullous pemphigoid with antidesmoplakin autoantibodies. Br J Dermatol. 1994;131:694-9.
- Okura M, Tatsuno Y, Sato M, Hashizume S, Kubota Y, Matsumura K, et al. Vesicular pemphigoid with antidesmoplakin autoantibodies. Br J Dermatol. 1997;136:794-6.
- Takahashi H, Wada T, Matsuo S, Iizuka K, Iizuka H. A case of bullous pemphigoid with antibodies against intercellular 130 kd antigen. J Dermatol. 1995;22:576-81.
- 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.
- Ishiko A, Hashimoto T, Shimizu H, Masunaga T, Nishibori Y, Watanabe K, et al. Combined features of pemphigus foliaceus and bullous pemphigoid: immunoblot and immunoelectron microscopic studies. Arch Dermatol. 1995;131:732-4.
- Matsubara K, Kanauchi H, Tanaka T, Imamura S. Coexistence of pemphigus and bullous pemphigoid. J Dermatol. 1995;22:68-71.
- Ninomiya J, Nakabayashi A, Sei Y, Takiuchi I. Bullous pemphigoid complicated with pemphigus vulgaris? Dermatology. 1994;189:117-9.
- Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, et al. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. J Invest Dermatol. 1998;110:103-9.
- España A. Estructura de la membrana basal. En: Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. Enfermedades ampollas. Madrid: Aula Médica; 2004. p. 17-21.
- Chan FL, Inoue S. Lamina lucida of basement membrane: an artefact. Microsc Res Tech. 1994;28:48-59.
- Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Díaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognized a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. J Immunol. 1993;151:5724-50.
- Zillikens D. BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes. Keio J Med. 2002;51:21-8.
- 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.
- Balding SD, Díaz LA, Giudice GJ. A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like homotrimeric complex. Biochemistry. 1997;36:8821-30.
- Herrero-González JE, Brauns O, Egner R, Ronspeck W, Mascaró JM Jr, Jonkman MF, et al. Immunoadsorption 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.
- Liu Z, Díaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. J Clin Invest. 1993;92:2480-8.
- Fujiwara S, Kohno K, Iwamatsu A, Naito I, Shinkai H. Identification of a 450-kDa human epidermal autoantigen as a new member of the plectin family. J Invest Dermatol. 1996;106:1125-30.
- Fujiwara S, Shinkai H, Takayasu S, Owaribe K, Tsukita S, Kageshita T. A case of sub-epidermal blister disease associated with autoantibody against 450 kD protein. J Dermatol. 1992;19:610-3.
- Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi A, et al. A vesicular bullous pemphigoid with an autoantibody against plectin. Br J Dermatol. 2000;142:813-5.
- Laffitte E, Favre B, Fontao L, et al. Plectin, an unusual target antigen in bullous pemphigoid. Br J Dermatol. 2001;144:136-8.

27. 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.
28. Chan LS, Majmudar AA, Tran HH, Meier F, Schaumburg-Lever G, Chen M, et al. Laminin-6 and laminin 5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1997;108:848-53.
29. 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.
30. 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.
31. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1986;103:1577-86.
32. Uitto J, Chung-Honet LC, Christiano AM. Molecular biology and pathology of type VII collagen. *Exp Dermatol.* 1992;1:2-11.
33. Christiano AM, Rosenbaum LM, Chung-Honet LC, Parente MG, Woodley DT, Pan TC, et al. 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.
34. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, et al. 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.
35. 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.
36. 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;84:472-6.
37. 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.
38. Mutasim DF, Pelc NJ, Supapannachart N. Established methods in the investigation of bullous diseases. *Dermatol Clin.* 1993;11:399-418.
39. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:803-22.
40. Morrison LH. Direct immunofluorescence microscopy in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clin Dermatol.* 2001;19:607-13.
41. Alonso Llamazares J. Inmunofluorescencia en enfermedades ampollas autoinmunes En: Mascaró Galy JM, España Alonso A, editores. *Enfermedades ampollas.* Madrid: Aula Médica; 2004. p. 22-32.
42. Huilgol SC, Bhogal BS, Black MM. Immunofluorescence of the immunobullous disorders part one: Methodology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 1995;61:187-95.
43. Bean SF. Proper biopsy technique for immunofluorescence tests on skin. *J Dermatol Surg.* 1976;2:148-50.
44. Weigand DA. Effect of anatomic region on immunofluorescence diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 1985;12(2 Pt 1):274-8.
45. Nisengard RJ, Blaszczyk M, Chorzelski T, Beutner. Immunofluorescence of biopsy specimens: comparison of methods of transportation. *Arch Dermatol.* 1978;114:1329-32.
46. 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.
47. Skeete MV, Black MM. The evaluation of a special liquid fixative for direct immunofluorescence. *Clin Exp Dermatol.* 1977;2:49-56.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Zeina B, Allen J, Wojnarowska FD, Dean D, Al-assad S, Daoud S, et al. Effectiveness of honey as a transport and storage medium for skin: the evidence from direct immunofluorescence. *JEADV.* 2005; 19 Suppl 2:302.
52. 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.
53. Dikiçioğlu 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.
54. 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.
55. 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;22:664-70.
56. 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;24:946-51.
57. 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.
58. Ockleford C. The confocal laser scanning microscope (CLSM). *J Pathol.* 1995;176:1-2.

59. Paddock SW. Further developments of the laser scanning confocal microscope in biomedical research. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;213:24-31.
60. 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.
61. 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.
62. Veiro JA, Cummins PG. Imaging of skin epidermis from various origins using confocal laser scanning microscopy. *Dermatology*. 1994;189:16-22.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. De Jong MC, Bruins S, Heeres K, Jonkman MF, Nieboer C, Boorsma DM, et al. Bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. Differentiation by fluorescence overlay antigen mapping. *Arch Dermatol*. 1996;132:151-7.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Campos M, Silvente C, Lecona M, Suárez R, Lázaro 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.
72. Prost C, Dubertret L, Fosse M, Wechsler J, Touraine R. A routine immunoelectron microscopic technique for localizing an autoantibody on epidermal basement membrane. *Br J Dermatol*. 1984;110:1-7.
73. 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.
74. Burnham TK. Indirect cutaneous immunofluorescence. II. Clinical significance. *J Clin Pathol*. 1973;26:268-72.
75. Kanitakis J. Indirect immunofluorescence microscopy for the serological diagnosis of autoimmune blistering skin diseases: a review. *Clin Dermatol*. 2001;19:614-21.
76. 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.
77. Kelly SE, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol*. 1988;118:31-40.
78. Onodera Y, Shimizu H, Hashimoto T, Ishiko A, Ebihara T, Tanaka M, et al. 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.
79. 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.
80. 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.
81. Zillikens D, Ishiko A, Jonkman MF, Chimanovitch I, Shimizu H, Hashimoto T, et al. Autoantibodies in anti-p200 pemphigoid stain skin lacking laminin 5 and type VII collagen. *Br J Dermatol*. 2000;143:1043-
82. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol*. 1978;31:507-20.
83. 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. 33-9.
84. 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.
85. Giudice GJ, Wilske KC, Anhalt GJ, Fairley JA, Taylor AF, Emery DJ, et al. Development of ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J Invest Dermatol*. 1994;102:878-81.
86. 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;288:507-9.
87. Zillikens D, Mascaró JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, 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.
88. Chimanovitch I, Hamm H, Georgi M, Kroiss M, Stolz W, Apitz C, et al. 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.
89. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, et al. BP180 ELISA using bac-

- terial recombinant NC16A protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2002;30:224-32.
90. 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.
  91. Amo YT, Ohkawa M, Tatsuta Y, Hamada T, Fujimura KK, 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.
  92. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic protein and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2002;30:224-32.
  93. Lee JB, Fumimori T, Kurose K, Mori O, Hashimoto T. A case of bullous pemphigoid successfully treated by plasmapheresis: assessment of the change in titers of circulating antibodies by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Dermatol.* 2003;30:326-31.
  94. 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.
  95. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Biología molecular de la célula.* Barcelona: Omega; 2004.
  96. Pas HH. Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Clin Dermatol.* 2001; 19:622-30.
  97. 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;76:4350-4.
  98. 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.
  99. Umemoto N, Demitsu T, Toda S, Noguchi T, Suzuki SI, Kakurai M, et al. A case of anti-p200 pemphigoid clinically mimicking inflammatory epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol.* 2003;148:1058-60.
  100. Shimanovich I, Hirako Y, Sitaru C, Hashimoto T, Brocker EB, Butt E, et al. 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.
  101. Cho SB, Kim SC. A Korean case of anti-p200 pemphigoid. *Yonsei Med J.* 2003;44:931-4.
  102. Furukawa H, Miura T, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F, Ishii F, et al. 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.
  103. 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.
  104. 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.
  105. Yamada T, Suzuki M, Koike Y, Kida K, Murata S, Ishii N, et al. A case of epidermolysis bullosa acquisita with autoantibody to anti-p200 pemphigoid antigen and exfoliative esophagitis. *Dermatology.* 2006;212:381-4.
  106. 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.
  107. Murakami H, Nishioka S, Setterfield J, Bhogal BS, Black MM, Zillikens D, 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.