



## CARTA - DERMATOPATOLOGIA

### Imuno-histoquímica para colágeno IV em doenças bolhosas autoimunes: definindo a localização das bolhas subepidérmicas<sup>☆,☆☆</sup>

Prezado Editor,

O penfigoide bolhoso (PB) é a doença bolhosa autoimune (DBA) mais comum.<sup>1</sup> Critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos compatíveis são necessários para diferenciar entre DBAs.<sup>1,2</sup> Na investigação dos tipos com bolhas subepidérmicas, o nível de clivagem da bolha e o alvo exato dos autoanticorpos patogênicos (apontados pela deposição das imunorreações) são fundamentais para fazer um diagnóstico correto.<sup>1</sup>

O PB e a epidermólise bolhosa adquirida (EBA) podem assemelhar-se clínica e histopatologicamente. Estudos adicionais, como imunofluorescência indireta (IFI) e/ou imunofluorescência direta (IFD) na pele do paciente utilizando a técnica de *salt-split skin*, são necessários para diferenciar entre essas duas entidades.<sup>1,2</sup> Entretanto, as técnicas requerem tecido fresco congelado e equipamento de laboratório sofisticado.<sup>3</sup>

A imuno-histoquímica (IHQ) também tem sido usada para estudar a localização dos componentes da membrana basal e a presença de imunorreações em DBAs, particularmente em PB.<sup>3-5</sup> O colágeno IV é o componente principal da junção dermoepidérmica, encontrado principalmente na lâmina densa.<sup>5</sup> A realização de IHQ para colágeno IV em biópsias de pele fixadas em formalina e embocadas em parafina oferece um meio econômico de diferenciar entre as DBAs subepidérmicas.<sup>3-6</sup>

O objetivo do presente artigo foi avaliar a utilidade da IHQ para colágeno IV em casos de PB atendidos na instituição dos autores. Para isso, foi conduzido estudo retrospectivo e observacional que incluiu todos os pacientes de PB diagnosticados entre janeiro de 2000 e junho de 2020.

O diagnóstico dos casos de PB foi estabelecido com base na combinação de critérios que abrangem a presença de caracte-

**Tabela 1** Características epidemiológicas e clinicopatológicas da IHQ para colágeno IV nos casos de PB avaliados

	Número de pacientes, n (%) n = 194
<b>Gênero masculino</b>	116 (59,8%)
<b>Idade (média ± DP) (anos)</b>	75,89 (±9,57 DS)
<b>Comorbidades neurológicas</b>	77 (39,7)
<b>Comorbidades neoplásicas</b>	36 (18,6)
<b>Diagnóstico de DM2</b>	80 (41,2)
<b>Apresentação clínica</b>	
Generalizada	55 (28,4)
Tronco e extremidades	102 (52,5)
Tronco	10 (5,2)
Extremidades	26 (13,4)
Outra	1 (0,5)
<b>Envolvimento do couro cabeludo</b>	16 (9,8)
<b>Envolvimento da mucosa</b>	12 (6,2)
<b>Características histopatológicas (HE)</b>	
Bolha subepidérmica	194 (100)
Infiltrado inflamatório	194 (100)
<b>Quantidade de infiltrado eosinofílico (HE)</b>	
Presente, muito acentuado	131 (67,5)
Presente, discreto	59 (30,4)
Ausente	4 (2)
<b>Padrão de imunofluorescência direta (IFD)</b>	
IgG + C3 linear	131 (67,4)
C3 linear	47 (24,2)
IgG linear	4 (2,1)
IFD Negativa	8 (4,2)
Outro	4 (2,1)

C3, complemento C3; HE, Hematoxilina & eosina; IgG, imunoglobulina G; IgM, imunoglobulina M; IgA, imunoglobulina A; N, número total; DP, desvio padrão; %, porcentagem.

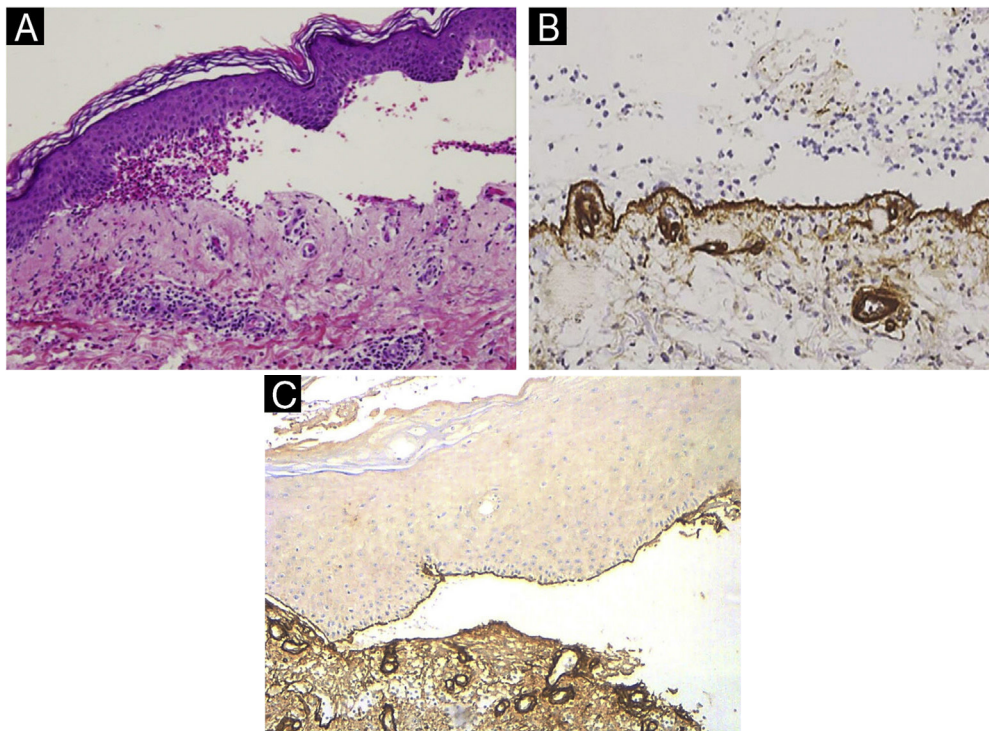
rísticas clínicas compatíveis, achados histopatológicos típicos e a presença de um padrão de IFD compatível (depósitos lineares de C3, IgG, IgM e/ou IgA ao longo da junção dermoepidérmica) e/ou IFI/ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) positivo (detecção de anticorpos antimembrana basal epidérmica IgG circulantes por estudos de microscopia de IFI usando pele humana normal processada pela técnica de *salt-split skin* e/ou detecção de anticorpos IgG anti-BP180 e/ou anti-BP230 por ELISA [teste de perfil anti-pele MESACUP]).

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.04.014>

☆ Como citar este artigo: Nieto-Benito LM, Parra-Blanco V, Suárez-Fernández RM. Collagen IV immunohistochemistry and autoimmune bullous diseases: defining the location of the subepidermal bullae. *An Bras Dermatol.* 2025;100. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.04.014>.

☆☆ Trabalho realizado no Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Espanha.



**Figura 1** (A) Histopatologia da bolha de paciente com PB (Hematoxilina & eosina, 10 $\times$ ): bolha subepidérmica com infiltrado inflamatório eosinofílico. (B) Imuno-histoquímica para colágeno IV em PB (20 $\times$ ). Observe a localização do colágeno IV (linha marrom) no assoalho da bolha. (C) Imuno-histoquímica para colágeno IV realizada em paciente com EBA (10 $\times$ ). A positividade é observada no teto da bolha e em estruturas dérmicas que contêm colágeno IV, como as paredes vasculares.

Todos os casos com diagnóstico confirmado foram incluídos se, pelo menos, três dos quatro critérios estivessem presentes e fossem compatíveis: clínico, histopatológico, sorológico, incluindo IFI e/ou ELISA e IFD. A biópsia de pele corada pelo método de hematoxilina & eosina (HE) e a IFD foi realizada em todos os pacientes incluídos no estudo, e os resultados de pelo menos um estudo imunológico (IFI e/ou ELISA) precisavam estar disponíveis.

Para avaliar o nível da bolha e diferenciar o PB de outras doenças bolhosas subepidérmicas, a técnica IHQ para colágeno tipo IV foi realizada em cortes de tecido fixados em formalina e emblocados em parafina (Diagnostic Biosystems Mob229/PDM276, Mouse AntiHuman Collagen IV, purificado, anticorpo policlonal, IgG1, diluição 1/10-1/40). A imunomarcagem na porção dérmica da bolha (assoalho) foi considerada compatível com PB.

De um total de 257 casos de PB, a IHQ para colágeno IV foi realizada em 194 (tabela 1); nos 63 restantes, essa técnica ainda não estava disponível na instituição dos autores na época da biópsia.

Bolhas subepidérmicas acompanhadas pelo infiltrado inflamatório característico estavam presentes em todos os pacientes. Em 67,5% a quantidade de infiltrado eosinofílico foi muito grande (> 21 eosinófilos/40 $\times$  campo de grande aumento; fig. 1A); 93,7% apresentaram depósitos lineares de IgG e/ou C3 na membrana basal na IFD. Em 193 deles, o colágeno IV foi detectado no assoalho da bolha na técnica IHQ (fig. 1B).

Em comparação os casos de EBA (confirmados pela presença de autoanticorpos contra o colágeno VII detectados por ELISA [teste de perfil anti-pele MESACUP]) atendidos no mesmo

período do estudo (n=5) evidenciaram imunomarcagem para colágeno IV no teto da bolha (fig. 1C). A IFD de pele na técnica de *salt-split skin*, provavelmente em virtude das limitações técnicas, levou à diferenciação entre PB e EBA em apenas um caso.

Em comparação com a IFD com técnica de *salt-split skin*, a IHQ é uma técnica simples e reproduzível, que pode ser realizada em cortes histológicos da bolha fixados em formalina e emblocados em parafina, sem a necessidade de processamento adicional.<sup>6-8</sup> Ao demonstrar a localização do colágeno IV pela IHQ, o nível de clivagem da bolha pode ser estabelecido e, portanto, pode ser útil no diagnóstico de DBA subepidérmicas.<sup>7,8</sup>

O colágeno IV está localizado na lâmina densa. Todas as estruturas relacionadas ao hemidesmossomo e à lâmina lúcida [incluindo o antígeno BP 1 (BPAG1/BP230) e o antígeno BP 2 (BPAG2/BP180), laminina 1 $\gamma$ , laminina 332, integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 6] estão localizadas acima da lâmina densa; o colágeno VII, entretanto, está posicionado abaixo do colágeno IV.<sup>8</sup> Portanto, ao realizar IHQ para colágeno IV nas DBA subepidérmicas, a imunomarcagem estará presente no assoalho da bolha, exceto na EBA e no lúpus eritematoso (tabela 2).<sup>9,10</sup>

Essa técnica tem a limitação de que apenas a localização do colágeno IV está sendo marcada, e a presença de imunorreagentes ou depósitos não pode ser avaliada. Na técnica *salt-split skin*, o nível de clivagem é induzido na lâmina lúcida e, por meio de IFD, a presença de imunodepósitos pode ser avaliada.

Este estudo apresenta várias limitações pela falta de grupo controle, número escasso de casos de EBA e ausência de outros pacientes com outras doenças bolhosas do grupo penfigoide ou não.

**Tabela 2** Imuno-histoquímica para colágeno IV em doenças bolhosas autoimunes subepidérmicas

Doença bolhosa subepidérmica autoimune	Antígeno (alvo dos autoanticorpos patogênicos)	IHQ para colágeno IV (realizada em biopsia bolhas cutâneas fixadas em formalina)
Penfigoide bolhoso	BP180, BP230, p105, p200 (laminina 1 $\gamma$ )	Marcação no assoalho da bolha (parte dérmica)
EBA	Colágeno VII	Marcação no teto da bolha (parte epidérmica)
Penfigoide gestacional	BP180	Marcação no assoalho da bolha (parte dérmica)
Dermatite herpetiforme	Transglutaminase tecidual e epidérmica (TG2, TG3)	Marcação no assoalho da bolha (parte dérmica)
Penfigoide da membrana mucosa	BP180, BP230, laminina 332, $\alpha$ 4 $\beta$ 6 integrina	Marcação no assoalho da bolha (parte do córion conjuntivo)
Dermatite por IgA linear	BP180, BP230	Marcação no assoalho da bolha (parte dérmica)
Lúpus eritematoso sistêmico bolhoso	Colágeno VII	Marcação no teto da bolha (parte epidérmica)

PB, penfigoide bolhoso; EBA, epidermólise bolhosa adquirida; IHQ, imuno-histoquímica; TG, transglutaminase.

Embora amplamente conhecido,<sup>3-5,7,8</sup> após revisão da literatura publicada e por meio das observações do autores, os mesmos consideram que a IHQ para colágeno IV deve ser mais frequentemente utilizada na investigação diagnóstica das DBAs.<sup>9,10</sup> Destaca-se que essa imunomarcagem é uma primeira abordagem perfeita no estudo de uma lesão bolha, em geral, e, especialmente, na suspeita de DBA. Além disso, os resultados das técnicas referência (IFD e/ou IFD/IFI na técnica *salt-split skin*) podem ser melhor interpretados juntamente com os achados da IHQ para colágeno IV.<sup>3-5,7,8,10</sup>

## Suporte financeiro

Nenhum.

## Contribuição dos autores

Lula María Nieto Benito: Concepção e planejamento do estudo; obtenção dos dados, contribuiu com dados ou ferramentas de análise, realizou a análise, elaboração e redação do manuscrito e aprovação da versão final do manuscrito.

Verónica Parra-Blanco: Concepção e planejamento do estudo, Investigação, Validação, elaboração e redação do manuscrito, revisão e edição do manuscrito.

Ricardo María Suárez-Fernández: Concepção e planejamento do estudo, obtenção dos dados, contribuiu com dados ou ferramentas de análise, realizou a análise, elaboração e redação do manuscrito e aprovação da versão final do manuscrito.

## Conflito de interesses

Nenhum.

## Referências

- Borradori L, Ven Beek N, Feliciani C, Tedbirt B, Antiga E, Bergman R, et al. Updated S2k guidelines for the management of bullous pemphigoid initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2022;36:1689-704.
- Meijer JM, Diercks GFH, de Lang EWG, Pas HH, Jonkman MF. Assessment of diagnostic strategy for early recognition of bullous and nonbullous variants of pemphigoid. *JAMA Dermatol.* 2019;155:158-65.
- Yeol Lee H, Ham SP, Choi YW, Park HJ. The value of Type IV collagen immunohistochemical staining in the differential diagnosis of autoimmune subepidermal bullous diseases. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2018;26:133-8.
- Pardo RJ, Penneys NS. Location of basement membrane type IV collagen beneath subepidermal bullous diseases. *J Cutan Pathol.* 1990;17:366-441.
- Sasaki T, Amano S, Nishiyama T, Nakayama Y, Burgeson RE, Nakajima H. Expression of laminin 5, and collagen IV and VII in bullous pemphigoid skin. *Arch Dermatol Res.* 1998;290:283-5.
- Abreu-Velez AM, Howard MS. Collagen IV in normal skin and in pathological processes. *N Am J Med Sci.* 2012;4:1-8.
- García-Díez I, Martínez-Escala ME, Ishii N, Hashimoto T, Mascaró-Galy JM, Pujol RM, et al. Usefulness of a simple immunohistochemical staining technique to differentiate anti-p200 pemphigoid from other autoimmune blistering diseases: a report of 2 cases. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108:e1-5.
- Lau I, Goletz S, Holtsche MM, Zillikens D, Fechner K, Schmidt E. Anti-p200 pemphigoid is the most common pemphigoid disease with serum antibodies against the dermal side by indirect immunofluorescence microscopy on human salt-split skin. *J Am Acad Dermatol.* 2019;81:1195-7.
- El-Domyati M, Abdel-Wahab H, Ahmad H. Immunohistochemical localization of basement membrane laminin 5 and collagen IV in adult linear IgA disease. *Int J Dermatol.* 2015;54:922-8.
- Halagovec A, Héjč F, Baranová Z. Fibronectin, interstitial collagens and type IV collagen in dermatitis herpetiformis. *Cas Lek Cesk.* 1996;135:273-6.

Lula María Nieto-Benito <sup>a,\*</sup>, Verónica Parra-Blanco <sup>b</sup> e Ricardo María Suárez-Fernández <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Dermatología, Clínica Universidad de Navarra, Madrid, Espanha

<sup>b</sup> Departamento de Patología, Dermatopatología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Espanha

<sup>c</sup> Departamento de Dermatología, Dermatopatología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Espanha

\* Autor para correspondência.

E-mail: [lula.m.nieto@gmail.com](mailto:lula.m.nieto@gmail.com) (L.M. Nieto-Benito).

Recebido em 10 de fevereiro de 2024; aceito em 21 de abril de 2024