

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



Nombre del estudio: Correlación de la expresión del marcador C4d y resultados de inmunofluorescencia en biopsias cutáneas.

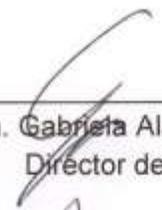
POR

Dr. Eric Eduardo Mendoza Oviedo

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
ANATOMÍA PATOLÓGICA

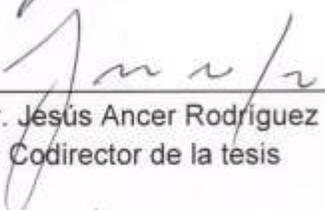
CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR C4D Y RESULTADOS  
DE INMUNOFLORESCENCIA EN BIOPSIAS CUTÁNEAS

**Aprobación de la tesis:**



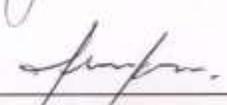
---

Dra. Gabriela Alarcón Galván  
Director de la tesis



---

Dr. Jesús Ancer Rodríguez  
Codirector de la tesis



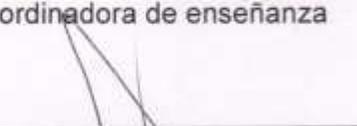
---

Dra. Ivett C. Miranda Maldonado  
Colaborador en el estudio de tesis



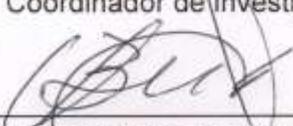
---

Dra. Med. Raquel Garza Guajardo  
Coordinadora de enseñanza



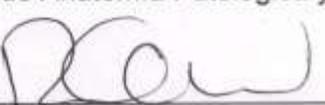
---

Dr. Med. Juan Pablo Flores Gutiérrez  
Coordinador de investigación



---

Dra. Med. Oralia Barboza Quintana  
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología



---

Dra. Med. Raquel Garza Guajardo  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

## TABLA DE CONTENIDO

Página

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2-19</b>
2.1. El sistema del complemento.	
2.2. Nomenclatura.	
2.3. Vía clásica del complemento.	
2.4. Vía de la lectina del complemento.	
2.5. Fracción C4d del complemento y estudios relacionados.	
2.6. Inmunofluorescencia directa en el estudio de las biopsias cutáneas.	
2.7. Enfermedades cutáneas con patrón de IF directa intercelular/superficie celular.	
2.7..1. Pénfigo.	
2.7..1.1. Pénfigo vulgar.	
2.7..1.2. Pénfigo foliáceo.	
2.7..1.3. Pénfigo paraneoplásico.	
2.8. Enfermedades cutáneas con patrón de IF directa lineal en la zona de membrana basal.	
2.8..1. Penfigoide ampolloso.	
2.8..2. Penfigoide gestacional.	
2.8..3. Dermatitis lineal por IgA.	
2.9. Enfermedades cutáneas con patrón de IF directa granular en la zona de membrana basal.	
2.9..1. Lupus eritematoso sistémico.	
2.9..2. Lupus discoide.	

<b>3. JUSTIFICACIÓN E IMPACTO DEL TRABAJO.....</b>	<b>20</b>
<b>4. HIPÓTESIS E HIPÓTESIS NULA.....</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
5.1. Objetivo principal.	
5.2. Objetivos específicos.	
<b>6. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>23-27</b>
6.1. Criterios de inclusión.	
6.2. Criterios de exclusión.	
6.3. Clasificación de casos de acuerdo al diagnostico histológico.	
6.4. Evaluación del estudio de inmunofluorescencia directa.	
6.5. Evaluación de la técnica de inmunohistoquímica para C4d.	
6.6. Técnica de inmunohistoquímica para C4d.	
<b>7. ANALISIS ESTADISTICO.....</b>	<b>28</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>29-42</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>43-46</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47-48</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>49-51</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Blancos antigénicos en las variantes de Pénfigo.....	12
2. División por categoría de acuerdo al diagnóstico histopatológico.....	29
3. Tabla comparativa: pénfigo, patrón e intensidad para IgG y C3c por IF directa y patrón e intensidad para C4d por IHQ.....	36
4. Tabla comparativa: penfigoide, patrón e intensidad para IgG y C3c por IF directa y patrón e intensidad para C4d por IHQ.....	38
5. Tabla comparativa: lupus, patrón e intensidad para IgG, IgM, IgA y C3c por IF directa y patrón e intensidad para C4d por IHQ.....	41
6. Tabla de porcentajes de acuerdo a la categoría diagnóstica, patrón de IF y patrón en el estudio para C4d por IHQ.....	41

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Esquema de las tres vías de activación del complemento.....	6
2. Patrón intercelular/superficie celular por IF directa para IgG.....	9
3. Patrón lineal en membrana basal por IF directa para IgG.....	9
4. Patrón granular en membrana basal por IF directa para IgG.....	10
5. Estudio de IF directa con depósito de IgA en pared vascular.....	10
6. Estudio de IF directa con depósito de IgM en cuerpos citoides.....	11
7. Estudio de IF directa negativo para el depósito de inmunoglobulinas.....	11
8. Ampolla suprabasal con diagnóstico de pénfigo vulgar.....	13
9. Ampolla subcorneal con diagnóstico de pénfigo foliáceo.....	13
10. Ampolla suprabasal con diagnóstico de pénfigo paraneoplásico.....	14
11. Ampolla subepidérmica con diagnóstico de penfigoide ampoloso.....	16
12. Ampolla subepidérmica con diagnóstico de penfigoide gestacional.....	17
13. Vesícula subepidérmica con diagnóstico de dermatitis lineal por IgA.....	17
14. Dermatitis de interfase con diagnóstico de lupus discoide.....	19
15. Control para el marcador de IHQ C4d.....	26

<b>16. Patrón intercelular/superficie celular por IF directa para IgG en pénfigo..</b>	<b>31</b>
<b>17. Patrón lineal en membrana basal por IF directa para IgG en penfigoide...</b>	<b>32</b>
<b>18. Patrón lineal en membrana basal por IF directa para IgA en dermatitis lineal por IgA.....</b>	<b>33</b>
<b>19. Patrón granular en membrana basal por IF directa para IgG en lupus.....</b>	<b>34</b>
<b>20. Imagen comparativa: pénfigo, patrón intercelular para IgG por IF directa y por IHQ para C4d.....</b>	<b>37</b>
<b>21. Imagen comparativa: penfigoide, patrón lineal en membrana basal para IgG por IF directa y por IHQ para C4d.....</b>	<b>39</b>
<b>22. Imagen comparativa: lupus, patrón granular en membrana basal para IgG por IF directa y por IHQ para C4d.....</b>	<b>40</b>
<b>23. Imagen representativa de casos negativos, con positividad en pared vascular o en cuerpos citoides para el marcador de IHQ C4d.....</b>	<b>42</b>

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica</b>	<b>Página</b>
1. Porcentaje por categoría diagnóstica en el estudio de H&E.....	30
2. Porcentaje de los patrones de positividad en el estudio de IF directa.....	30
3. Patrón de expresión intercelular/superficie celular e intensidad en el estudio de IF directa.....	31
4. Patrón de expresión lineal en membrana basal e intensidad en el estudio de IF directa.....	32
5. Patrón de expresión granular en membrana basal e intensidad en el estudio de IF directa.....	34
6. Casos negativos, con positividad vascular o en cuerpos citoides en el estudio de IF directa.....	35
7. Porcentaje de los patrones de positividad en el estudio de IHQ para C4d.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **IHQ:** Inmunohistoquímica.
- **IF:** Inmunofluorescencia.
- **MB:** Membrana basal.
- **H&E:** Hematoxilina y eosina.

# 1. RESUMEN

## Introducción

El sistema del complemento está formado por un grupo de proteínas las cuales actúan en diversos estados patológicos y que se activan mediante 3 vías: clásica, lectina y alternativa. El fragmento C4d, el cual es un producto de la degradación de C4 de la vía clásica y lectina, unido de forma covalente a la célula blanco tiene una mayor probabilidad de permanecer en el sitio de activación del complemento, incluso después de que los propios anticuerpos se disocian con el tiempo. Se ha sugerido como una herramienta diagnóstica útil al detectarse su depósito en entidades con base inmunológica, correlacionando con el depósito de complejos inmunes, debido a que no siempre se cuenta con la infraestructura para la realización de estudios de inmunofluorescencia.

## Hipótesis

La presencia o ausencia de depósitos de inmunocomplejos detectados por inmunofluorescencia en biopsias cutáneas, correlaciona con la expresión positiva o negativa del marcador de inmunohistoquímica C4d.

## Material y métodos

Estudio retrospectivo, observacional y comparativo. De los archivos del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" se recabaron todas las biopsias cutáneas que cuentan con estudio de inmunofluorescencia en un periodo comprendido del 1/08/2008 al 30/08/2015.

## Resultados

Observamos una correlación entre la categoría diagnóstica y el estudio de IF del 100% para pénfigo, 92.6 % para penfigoide, 66.7 % para lupus. La correlación entre la categoría diagnóstica y el estudio de IHQ para C4d fue del 32.7 % para pénfigo, 29.6 % para penfigoide y 22.2 % para lupus.

## Conclusión

Es necesaria la realización de más estudios en correlación con la técnica de inmunofluorescencia directa, la cual sigue siendo el gold estándar.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El sistema del complemento

El sistema del complemento consiste en más de 30 proteínas séricas y de membrana que participan en la defensa del hospedero, así como en una amplia variedad de estados patológicos (1).

Dichas proteínas tienen la función de:

1. Promover la defensa del hospedero en contra de agentes infecciosos.
2. El aclaramiento de detritus celulares y complejos inmunes.
3. Regular la respuesta inmunológica.

Este sistema de proteínas es filogenéticamente más antiguo que las proteínas asociadas con la inmunidad adquirida y se encuentran presentes en organismos primitivos que carecen de inmunoglobulinas. Así mismo se presume que provee cierto nivel de inmunidad innata y defensa del hospedero, aun en ausencia de respuesta inmunológica (2).

El sistema del complemento se activa mediante 3 vías cuidadosamente controladas: clásica, lectina y alternativa (3).

La proteína conocida como "C3" es el punto de convergencia para las 3 vías de activación del complemento. Esta molécula de dos cadenas es sintetizada por muchas células, particularmente los hepatocitos, donde es liberada a la sangre en forma de cadena única, la cual se denomina "pro-C3", uniéndose a la superficie de su blanco.

## **2.2. Nomenclatura**

Por razones históricas, las nueve proteínas que conforman la vía clásica del complemento se designan con la letra C mayúscula, seguida de un número que se relaciona con el orden en el aparecen durante la reacción. Excepto para el C4 el cual actúa antes que C2.

Los fragmentos de las proteínas del complemento que resultan de la escisión proteolítica se designan por una letra minúscula anexa (ej. C4a, C4b) donde "a" representa un fragmento más pequeño y "b" representa un fragmento de mayor tamaño. Una mayor degradación de dichos fragmentos de mayor tamaño se designa con una letra minúscula consecutiva (C4c, C4d).

## **2.3. Vía clásica del complemento**

La vía clásica del complemento fue descrita alrededor del año 1900, siendo la primera en estudiarse y por esta razón se le denomina "clásica". Es responsable de la activación del complemento en la mayoría de las células sensibilizadas por anticuerpos.

Su activación generalmente requiere la interacción entre el antígeno y C1 unido al anticuerpo. El C1 es una macromolécula de 740 kDa la cual comprende una molécula única de C1q unido a dos cadenas de C1r y dos cadenas de C1s, las cuales se mantienen unidas en presencia de iones calcio. Una vez que C1q se une a la inmunoglobulina, este adopta un cambio conformacional que lleva a la autoactivación de las dos cadenas de C1r. El C1s<sub>2</sub> activado escinde el siguiente componente de la cascada, C4d.

En los seres humanos solo la inmunoglobulina M y G son eficaces en la activación de la vía clásica. Estas inmunoglobulinas difieren en su habilidad para activar la vía clásica. La molécula de IgM, con sus cinco sitios de unión, adopta una conformación funcionalmente activa sobre una superficie antigénica que permite múltiples interacciones con antígenos.

En contraste, el C1 unido a IgG requiere dos moléculas de IgG unidas una con otra.

Así mismo un gran número de moléculas tienen la habilidad de activar la vía clásica del complemento interactuando de forma directa con el C1q, entre las cuales se encuentran:

- Proteína C reactiva.
- Componente P del amiloide sérico.
- $\beta$ -amiloide.
- Algunas bacterias Gram negativas.
- Ciertos virus, mycoplasmas, protozoarios etc.
- Componentes intracelulares (ej. DNA, membranas mitocondriales, filamentos del citoesqueleto).
- Células apoptóticas (9).

## **2.4. Vía de la lectina del complemento**

Se trata de una tercer vía en la activación del complemento que utiliza la proteína sérica MBL (lectina de unión a manosa o proteína de unión a manosa).

Pertenece a una familia de moléculas denominadas colectinas (10), la cual incluye además de la MBL, las proteínas A y D del surfactante, congulinina bovina, CL-43 bovino y las ficolinas. Las ficolinas y la lectina de unión a manosa son moléculas solubles de reconocimiento de patrones activadoras del complemento, lo cual significa que reconocen “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs por sus siglas en inglés) en la superficie de los microorganismos.

Una vez que se unen con su PAMP específico, estas proteínas se someten a un cambio conformacional que les permite asociarse con una de las tres proteasas de serina relacionadas con la lectina de unión a manosa (MBL): MASP-1, MASP-2 o MASP-3, para activar la cascada del complemento (11).

Después de la activación, MASP-2 escinde C4 para generar la vía clásica C3 convertasa C4b2a (12).

Complejos antígeno-anticuerpo específicos también pueden activar a la vía de la lectina. Se ha demostrado que una fracción de la molécula de IgG que carece de residuos galactosa terminales (denominada IgG-G0), se encuentra en el plasma de pacientes con condiciones patológicas como artritis reumatoide, y tienen la habilidad de interactuar con la lectina de unión a manosa y activar la vía clásica (13).

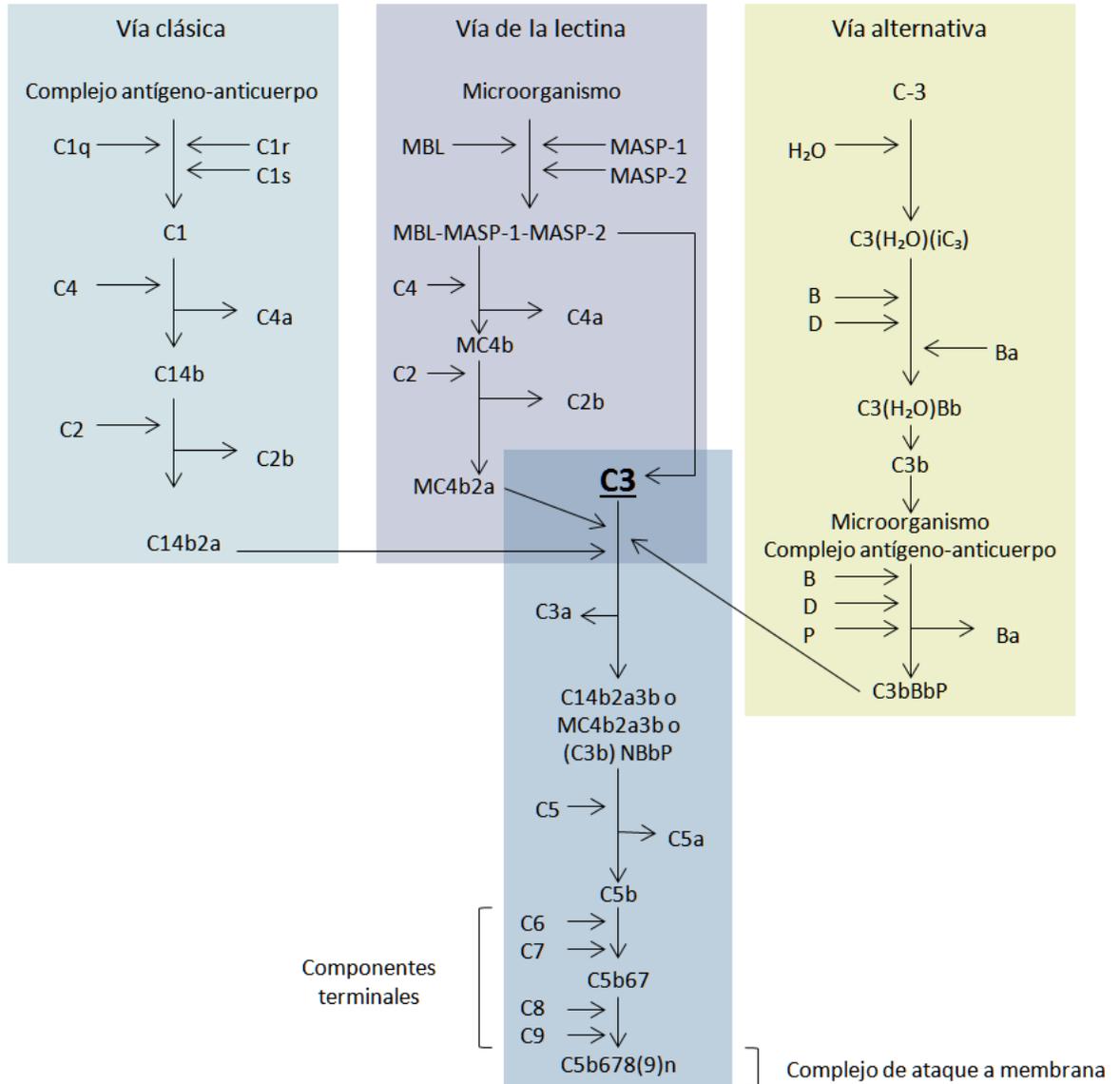


Fig. 1.- Esquema de las tres vías de activación del complemento: vía clásica, vía de la lectina y vía alternativa. Mediators of inflammation: complement, cytokines, and adhesion molecules. *H. Davis Massey, Richard A. McPherson. Capítulo 47.*

## **2.5 . Fracción C4d del complemento y estudios relacionados**

El C4d es un componente estable producto de la degradación del factor C4b del complemento y se encuentra relacionado a la activación de la vía clásica y a la vía de la lectina.

El fragmento C4d unido de forma covalente a la célula blanco tiene una mayor probabilidad de permanecer en el sitio de activación del complemento, incluso después de que los propios anticuerpos se disocian con el tiempo.

Al estar C4d firmemente anclado al tejido, actúa como una “huella” de la lesión tisular mediada por anticuerpos.

Casi la totalidad de los artículos publicados con respecto al C4d se encuentran relacionados con el rechazo humoral en injerto de órganos sólidos (3) (4).

Recientemente algunos artículos han descrito la expresión de C4d en otros eventos renales distintos del rechazo humoral tales como: lupus, nefropatía por IgA y nefropatía membranosa (6) (7).

El marcador C4d tiene buenos resultados en estudios de inmunohistoquímica.

Se ha sugerido como una herramienta diagnóstica útil al detectarse su depósito en entidades con base inmunológica, correlacionando con el depósito de complejos inmunes.

En piel se ha reportado en diversas entidades como LES, pénfigo, dermatomiositis. Sin embargo la cantidad de estudios aun son muy limitados (5).

## **2.6. Inmunofluorescencia directa en el estudio de las biopsias cutáneas**

La detección de complejos inmunes por inmunofluorescencia directa representa un auxiliar diagnóstico en las dermatosis con una base inmunológica. Para lo cual se requiere de tejido fresco/congelado y equipo de laboratorio especializado para la realización de dicho procedimiento (5).

Este estudio implica la sobre posición de la fluoresceína conjugada con anticuerpos (IgG, IgM, IgA), complemento (C3c) y fibrinógeno sobre secciones en congelado de biopsias.

En el caso particular de las biopsias cutáneas en enfermedades inmunoampollosas, dicha biopsia se debe de tomar de la piel perilesional de apariencia normal, a unos cuantos milímetros del borde de la ampolla. Si la biopsia se toma directamente de la ampolla o muy cerca, puede resultar en un falso negativo.

Existen patrones de depósito de inmunocomplejos en piel y que por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa y dependiendo de la entidad patológica, se visualizan ya sea en la superficie de los queratinocitos, a nivel de la membrana basal en forma lineal o granular.

Dichos patrones se pueden observar en diversas entidades, por lo cual la correlación clínico-patológica y con estudios de laboratorio es primordial.

Dentro de los patrones de expresión se encuentran:

- Patrón intercelular/superficie celular.
- Patrón lineal en membrana basal.
- Patrón granular en membrana basal.

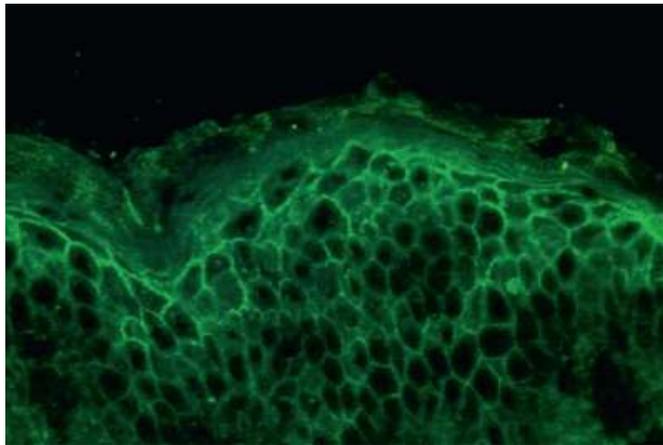


Fig. 2.- Estudio de inmunofluorescencia directa, en el cual se observa depósito de IgG en patrón intercelular/superficie celular.

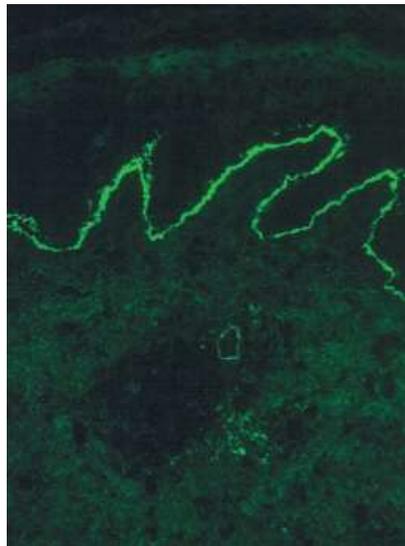


Fig. 3.- Estudio de inmunofluorescencia directa, en el cual se observa depósito de IgG en patrón lineal a nivel de la membrana basal.

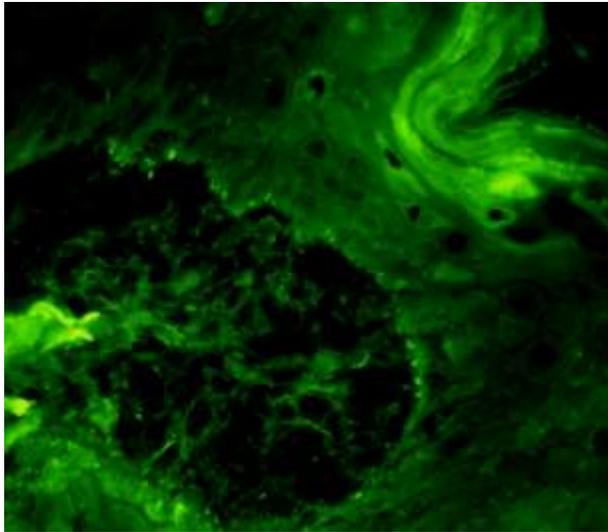


Fig. 4.- Estudio de inmunofluorescencia directa, en el cual se observa depósito de IgG en patrón granular a nivel de la membrana basal.

Así mismo, otros patrones de expresión que observamos con menor frecuencia son el tipo vascular y el de cuerpos citoides. El depósito de IgA en la pared de los vasos sanguíneos se presenta de forma exclusiva en la Púrpura de Henoch Shönlein, la vasculitis leucocitoclástica muestra depósitos inespecíficos de IgM en los vasos y el lupus o enfermedades de la colágena, entre otras, muestran la presencia de cuerpos citoides. Los casos negativos se caracterizan por la ausencia de depósito de inmunoglobulinas.



Fig. 5.- Estudio de inmunofluorescencia directa con depósito de IgA a nivel de pared vascular.

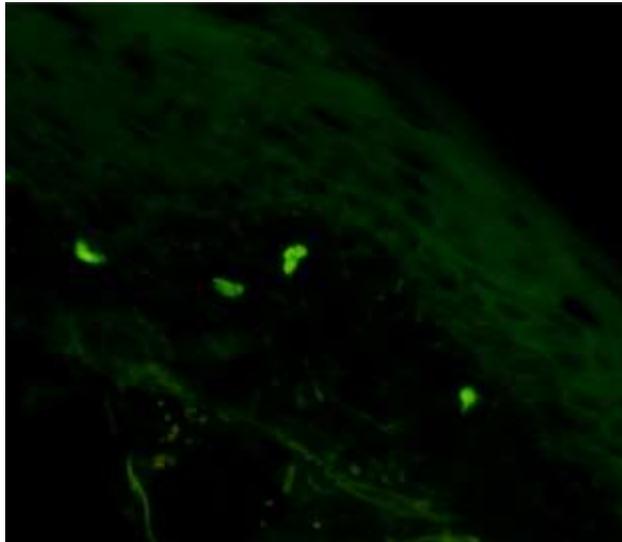


Fig. 6.- Estudio de inmunofluorescencia directa con depósito de IgM a nivel de cuerpos citoides.

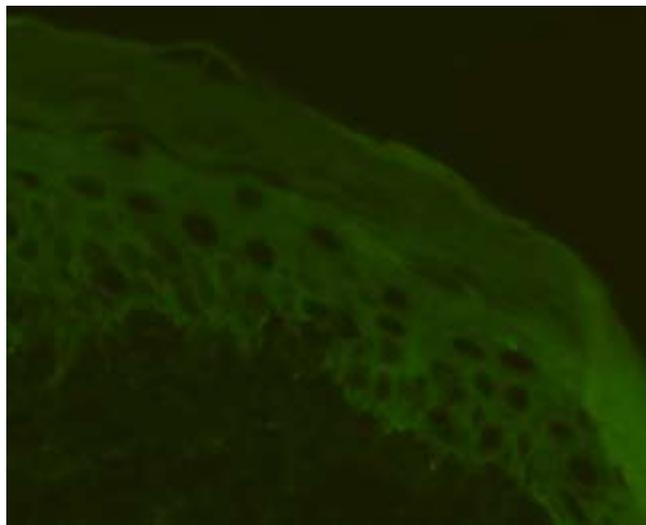


Fig. 7.- Estudio de inmunofluorescencia directa, negativo para el depósito de inmunoglobulinas, C3c y fibrinógeno.

## 2.7. Enfermedades cutáneas con patrón de IF directa intercelular/superficie celular

### 2.7.1. Pénfigo

El pénfigo (Gr, penfix, ampolla) se refiere a un grupo de enfermedades crónicas ampollosas que se desarrolla como consecuencia de auto-anticuerpos dirigidos contra una variedad de proteínas desmosomales (14-15).

Variante	Auto-antígeno
Pénfigo vulgar	Dsg 3 (mucoso), Dsg 1 (cutáneo), Dsc, penfaxina, receptor de $\alpha$ 9-acetilcolina.
Pénfigo foliáceo	Dsg 1
Pénfigo paraneoplásico	Desmoplaquina I y II, envoplaquina, periplaquina, BP230, plectina, Dsg 1, Dsg 3.

Tabla 1.- Blancos antigénicos en las variantes de Pénfigo. Dsg: Desmogleina; Dsc: Desmocolina.

Los hallazgos clínicos y, por lo tanto, la clasificación de estas enfermedades dependen del nivel de separación dentro de la epidermis.

#### 2.7.1.1. Pénfigo vulgar

Es la variante más común de pénfigo, representando hasta el 80% de los casos (16) y se caracteriza por ampollas flácidas que al romperse dejan áreas denudadas. El involucro de la mucosa oral es generalmente la manifestación inicial, en aproximadamente el 60 a 70 % de los casos (17).

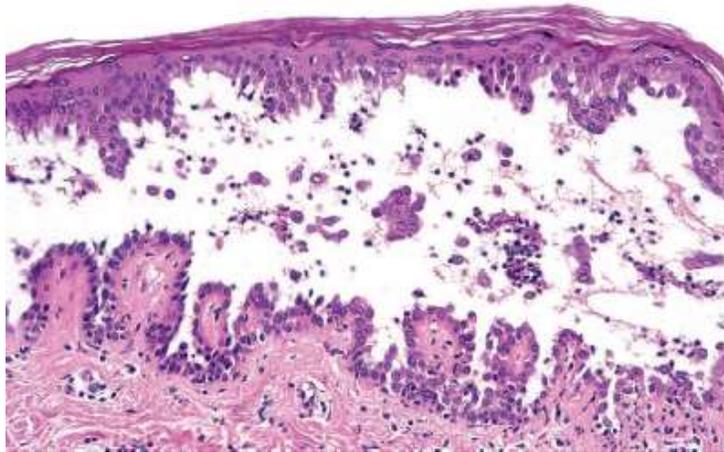


Fig. 8.- Ampolla con acantolisis marcada y neutrófilos dispersos. Las papilas dérmicas se proyectan hacia la cavidad en forma de papilas.

La inmunofluorescencia directa muestra la presencia de depósitos de IgG y C3c en un 90 a 100% de los casos a nivel intercelular/ superficie celular.

#### **2.7.1.2. Pénfigo foliáceo**

Se caracteriza clínicamente por la presencia de vesículas o ampollas que sanan dejando erosiones superficiales y con formación de costras. Afecta piel cabelluda, cara y tronco, sin involucrar mucosas.

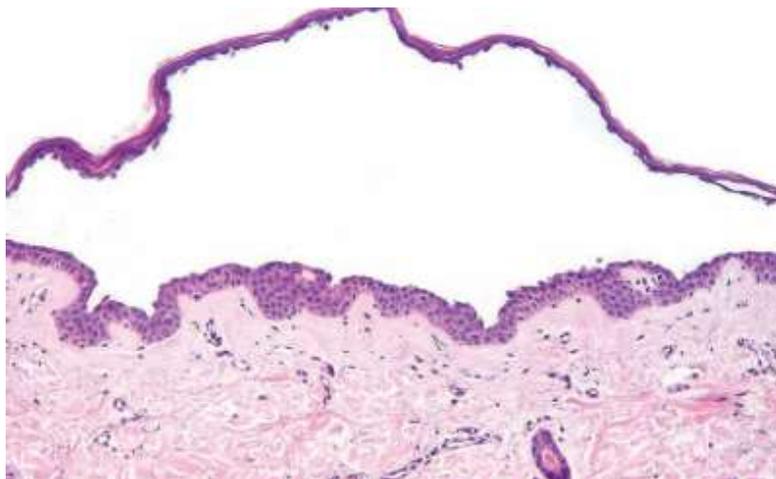


Fig. 9.- Ampolla subcorneal sin infiltrado inflamatorio intracavitario.

La inmunofluorescencia directa muestra un patrón idéntico al del pénfigo vulgar, observándose positividad para IgG (90-100%) y C3c a nivel intercelular/superficie celular.

### **2.7.1.3. Pénfigo paraneoplásico**

Es una enfermedad ampollosa asociada a diferentes enfermedades neoplásicas, como:

- Leucemia linfocítica crónica.
- Tumor de Castleman.
- Timoma.
- Macroglobulinemia de Waldenström.

En 2/3 de los casos la neoplasia se encuentra al momento de la presentación y en 1/3 el pénfigo paraneoplásico precede al tumor. Clínicamente se presenta con involucro oral severo y cutáneo polimórfico así como en áreas acrales.

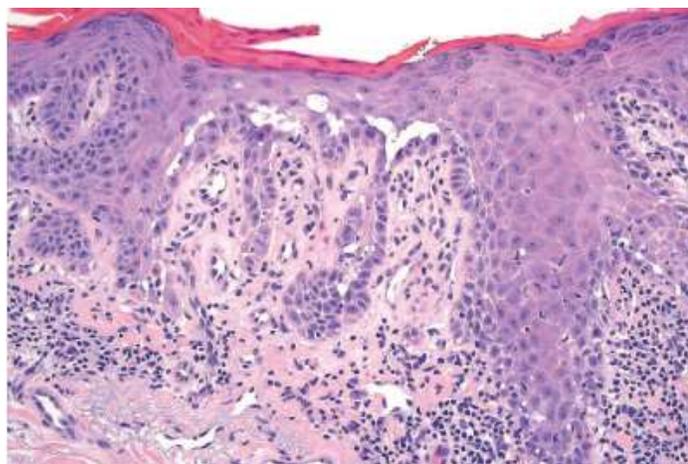


Fig. 10.- Imagen en la cual se observa acantolisis con la formación de hendiduras suprabasales.

El estudio de IF directa muestra un patrón de positividad débil y focal para IgG o C3c a nivel intercelular/superficie celular y lineal o granular a nivel de la membrana basal.

Otras entidades que presentan por inmunofluorescencia directa un patrón intercelular/superficie celular son:

- Pénfigo vegetante.
- Pénfigo eritematoso.
- Pénfigo por IgA.

## **2.8. Enfermedades cutáneas con patrón de IF directa lineal en la zona de membrana basal**

### ***2.8.1. Penfigoide ampolloso***

Clínicamente se presenta como ampollas tensas sobre una piel eritematosa, urticariforme o normal, con predominio en las zonas de flexión de pacientes típicamente por arriba de los 60 años y comúnmente asociado a prurito generalizado. El involucro de las mucosas se da en el 10 al 40% de los casos.

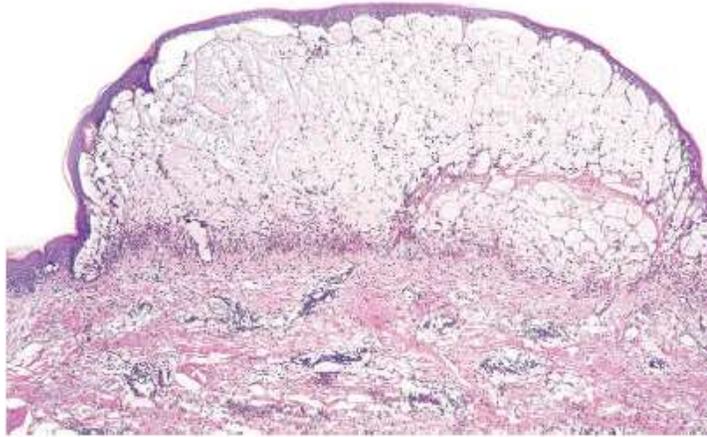


Fig. 11.- Ampolla subepidérmica tensa en forma de domo, la cual contiene edema, fibrina y células inflamatorias en su interior.

El estudio de inmunofluorescencia directa muestra positividad para IgG (90%) y C3c (> 90%) en patrón lineal a nivel de la membrana basal.

### ***2.8.2. Penfigoide gestacional***

Comienza usualmente durante el segundo y tercer trimestres del embarazo, pudiendo presentarse también durante el postparto (2 o 3 días después). Clínicamente se caracteriza por mostrar lesiones que van desde pápulas y placas hasta vesículas y ampollas. Típicamente no involucra las membranas mucosas.

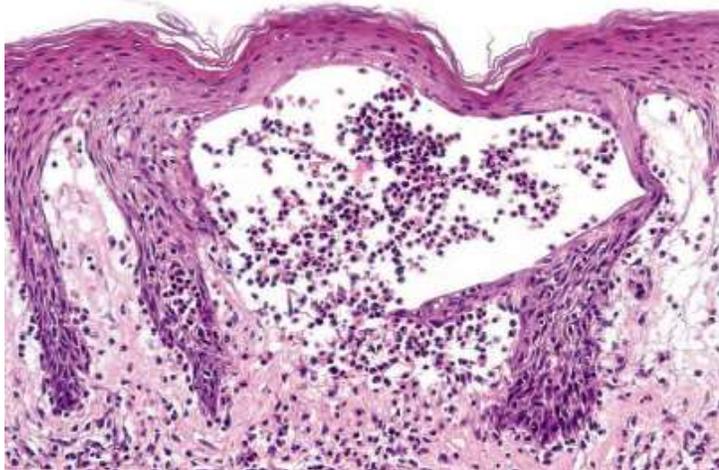


Fig. 12.- La cavidad de la ampolla contiene una gran cantidad de eosinofilos.

El patrón para IgG (aproximadamente 25% de los casos) y C3c (100%) es lineal a nivel de la membrana basal en el estudio de inmunofluorescencia directa.

### **2.8.3. Dermatitis lineal por IgA**

Se caracteriza clínicamente por presentarse como vesículas y ampollas sobre una piel normal o sobre placas urticariformes, involucrando más comúnmente el tronco, así como a las membranas mucosas.

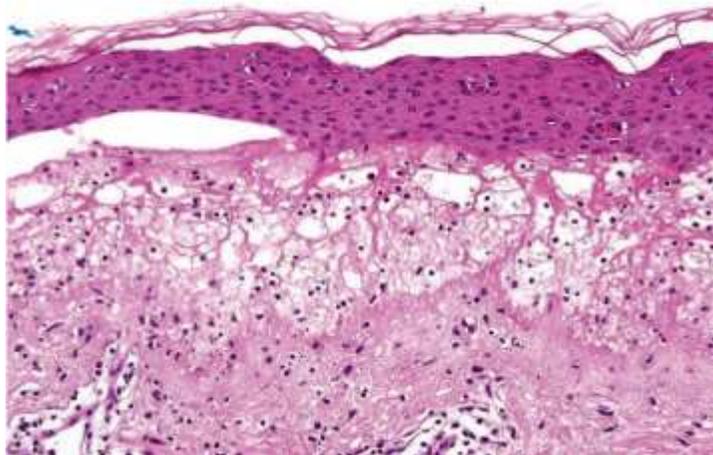


Fig. 13.- Vesícula subepidérmica con un gran contenido compuesto principalmente por neutrofilos.

El estudio de inmunofluorescencia directa se presenta en un patrón lineal a nivel de la membrana basal para IgA (necesario para el diagnóstico). Menos intenso para el depósito de IgG, IgM y C3c, igualmente a nivel de la membrana basal y de forma lineal.

Otras entidades que presentan característicamente un patrón lineal a nivel de

MB son:

- Liquen plano penfigoide.
- Lupus eritematoso ampolloso.
- Epidermólisis ampolloso adquirida.

## **2.9. Enfermedades cutáneas con patrón de IF directa granular en zona de membrana basal**

### ***2.9.1. Lupus eritematoso sistémico***

Es una enfermedad sistémica que afecta múltiples sistemas y que nivel cutáneo se expresa como un rash malar “en alas de mariposa”, el cual se exacerba con la exposición a la luz ultravioleta.

El patrón por inmunofluorescencia directa para IgG, IgM, IgA y C3c (> 90% en piel con lesión y exposición solar; 50% en piel sin lesión y expuesta al sol; 30% en piel sin lesión y sin exposición solar) es granular a nivel de la membrana basal.

### **2.9.2. *Lupus discoide***

Clínicamente es un rash discoide que típicamente se presenta como placas induradas, bien limitadas, eritematosas, con hiperqueratosis, atrofia, telangiectasia y tapón folicular, el cual más frecuentemente involucra la cara, piel cabelluda (pudiendo desarrollar alopecia cicatrizal), orejas, v del escote y zonas de extensión de los miembros superiores.

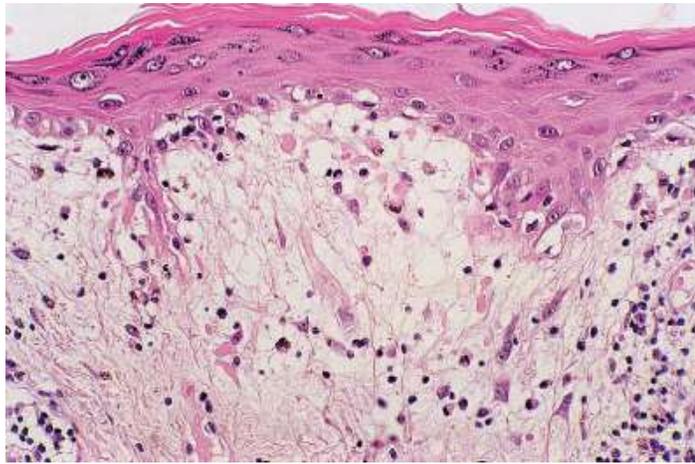


Fig. 14.- Presencia de múltiples cuerpos citoides a nivel de la dermis papilar, así como degeneración hidrópica de la basal.

El patrón por inmunofluorescencia directa para IgG e IgM (> 90% en piel lesionada) es granular a nivel de la membrana basal.

Otras entidades que presentan un patrón granular a nivel de la membrana basal por inmunofluorescencia directa son:

- Lupus eritematoso subagudo.
- Dermatitis herpetiforme.
- Enfermedad mixta del tejido conectivo.

### 3. JUSTIFICACIÓN E IMPACTO DEL ESTUDIO

El estudio de IF es el método gold standard en la identificación de depósitos de complejos inmunes en enfermedades autoinmunes cutáneas.

El estudio de IF requiere de una biopsia cutánea adicional al estudio histológico, en fresco o en un medio de fijación especial diferente al formol.

El estudio de IF requiere un microscopio de IF, un técnico especializado que sepa realizar la técnica y un patólogo con entrenamiento en técnica de IF.

El marcador C4d se ha sugerido como una herramienta diagnóstica útil al detectarse su depósito en entidades con base inmunológica, correlacionando con el depósito de complejos inmunes.

El marcador C4d tiene buenos resultados en estudios de inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica se realiza en tejido embebido en parafina.

Saber si la detección de la expresión del marcador C4d es útil como remplazo del estudio de IF en el diagnóstico de las enfermedades cutáneas de etiología autoinmune.

Debido a que en algunos casos no se cuenta con tejido en fresco o congelado para la realización de inmunofluorescencia directa, es importante contar con métodos auxiliares alternativos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La presencia o ausencia de depósitos de inmunocomplejos detectados por inmunofluorescencia en biopsias cutáneas, correlaciona con la expresión positiva o negativa del marcador de inmunohistoquímica C4d.

#### **HIPÓTESIS NULA**

La presencia o ausencia de depósitos de inmunocomplejos detectados por inmunofluorescencia en biopsias cutáneas, no correlaciona con la expresión positiva o negativa del marcador de inmunohistoquímica C4d.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo principal:**

Correlacionar la expresión del marcador C4d con los resultados de inmunofluorescencia en enfermedades cutáneas.

### **5.2 Objetivos específicos:**

1. Seleccionar biopsias cutáneas que cuenten con estudio de inmunofluorescencia y clasificar las biopsias de acuerdo al diagnóstico histológico.
2. Tabular resultados de inmunofluorescencia y clasificar de acuerdo al patrón e intensidad.
3. Tabular la expresión del marcador C4d y clasificar de acuerdo al patrón e intensidad.

## **6. MATERIAL Y METODOS**

Se realizo un estudio retrospectivo, observacional y comparativo.

De los Archivos del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, se realizo una búsqueda en el sistema PATHOX y se recabaron todas las biopsias cutáneas que contaron con estudio de inmunofluorescencia en un periodo comprendido del 1/08/2008 al 30/08/2015.

### **6.1 Criterios de inclusión**

Para la selección de los casos se utilizaron los siguientes criterios de inclusión:

1. Reporte anatomopatológico completo.
2. Bloque de parafina correspondiente.
3. Estudio de inmunofluorescencia y su reporte respectivo.

### **6.2 Criterios de exclusión**

Así mismo, los casos que no reunieran dichos criterios, y que presentaran alguno de los siguientes puntos, se excluyeron del estudio:

1. Tejido insuficiente para realizar estudio de inmunohistoquímica.
2. Ausencia de epidermis.
3. Defectos de fijación o en el procesamiento.

### **6.3 Clasificación de casos de acuerdo al diagnóstico histológico**

Los casos seleccionados fueron divididos de acuerdo al diagnóstico histopatológico mencionado en el reporte original del servicio de anatomía patológica, en las siguientes categorías:

- Categoría diagnóstica 1: Pénfigo.
- Categoría diagnóstica 2: Penfigoide.
- Categoría diagnóstica 3: Lupus.
- Categoría diagnóstica 4: Otros.

### **6.4 Evaluación del estudio de inmunofluorescencia directa**

Posteriormente se valoró el patrón y la intensidad de los marcadores de inmunofluorescencia (IgG, IgM, IgA y C3c) realizados a cada una de las biopsias cutáneas, dividiéndolos en 4 patrones: superficie celular/espacio intercelular, zona de membrana basal/lineal, zona de membrana basal/granular y otros (negativo, vascular o en cuerpos citoides).

Técnica del estudio de inmunofluorescencia directa: se realizaron cortes en congelado a 5 micras, con incubación de anticuerpos específicos para IgG, IgM, IgA y C3c, por 30 minutos. Utilizando controles adecuados.

Anticuerpos valorados: IgG, IgM, IgA y C3c.

### Patrón de expresión:

- Patrón 1: superficie celular/espacio intercelular.
- Patrón 2: zona de membrana basal/lineal.
- Patrón 3: zona de membrana basal/granular.
- Patrón 4: otros (negativo, vascular o en cuerpos citoides).

### Intensidad:

- 0 +: no se detecta.
- 1 +: se visualiza de forma intensa al 40x.
- 2 +: se visualiza de forma intensa al 10x.
- 3 +: se visualiza de forma débil en 5x.
- 4 +: se visualiza de forma intensa en 5x.

## **6.5 Evaluación de la técnica de inmunohistoquímica para C4d**

La interpretación de la tinción de C4d se realizó inicialmente por el tesista y en casos seleccionados se valoró en conjunto con el investigador principal. Se revisaron las biopsias de piel en busca de la expresión del marcador en los diversos compartimentos (superficie celular/espacio intercelular, membrana basal, vasos sanguíneos, cuerpos citoides o su negatividad), en los casos que presentaron un patrón de tinción en membrana basal, se dividió a su vez en patrón lineal o granular.

## 6.6 Técnica de inmunohistoquímica para C4d

Se realizaron cortes en micrótomo de 3 micras de grosor, tiñéndose con el anticuerpo de inmunohistoquímica C4d (revelado con 3,3' diaminobencidinatetrahidroclorada). Utilizando controles adecuados.

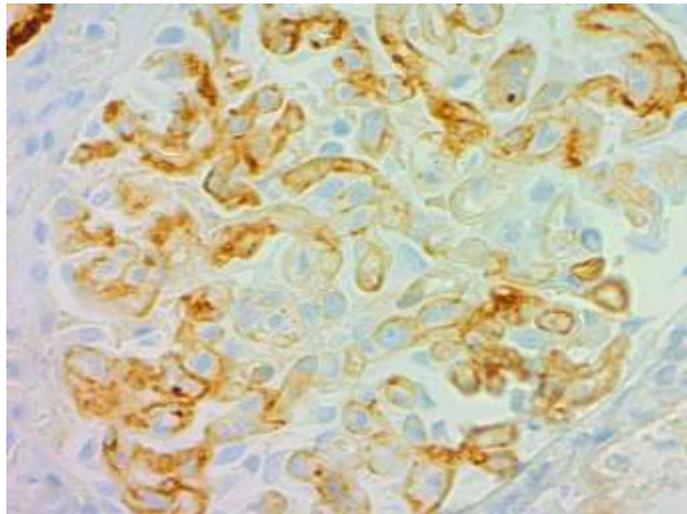


Fig. 15.- Corteza renal (40x) de riñón con diagnóstico de rechazo teñida con C4d: Tinción fuerte y difusa a nivel de la pared capilar.

Marcador evaluado: C4d

Patrón de expresión:

- Patrón 1: superficie celular/espacio intercelular.
- Patrón 2: zona de membrana basal/lineal.
- Patrón 3: zona de membrana basal/granular.
- Patrón 4: otros (negativo, vascular o en cuerpos citoides).

Intensidad:

- 0 +: no se detecta.
- 1 +: se visualiza de forma intensa al 40x.
- 2 +: se visualiza de forma intensa al 10x.
- 3 +: se visualiza de forma débil en 5x.
- 4 +: se visualiza de forma intensa en 5x.

## 7. ANALISIS ESTADISTICO

- Calculo del tamaño de la muestra para estudios de concordancia

$$N = \frac{4 \cdot p_d \cdot (1 - p_d) \cdot (Z_{\alpha})^2}{IC_{2d}}$$

IC<sub>2d</sub>

En donde:

- ▶  $Z_{\alpha}$ : desviación estandarizada del nivel de significación.
- ▶  $P_d$ : probabilidad estimada de desacuerdo entre observadores.
- ▶  $IC_d$ : Intervalo de confianza que se aceptara del grado de desacuerdo.

$$N = \frac{4 \cdot (.10) \cdot (8.90) \cdot (3.84)^2}{0.01} = 139 \text{ unidades muestrales.}$$

0.01

- Los resultados se reportaron en tablas de contingencia, frecuencia, porcentajes y medidas de tendencia central.

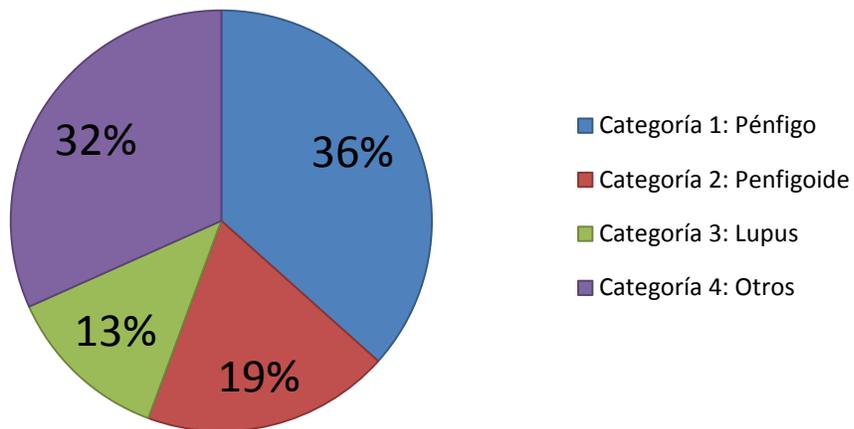
## 8. RESULTADOS

De acuerdo a los criterios de selección y exclusión se obtuvo un total de 328 biopsias cutáneas, de estas se seleccionaron solo 142 casos, cumpliendo con las unidades muestrales estadísticamente fijadas. 56 casos (39.5 %) fueron del género masculino y 86 casos (60.5 %) del género femenino. El rango de edad se encontraba entre los 11 y los 92 años (media de 47 años).

Los casos se dividieron en las siguientes 4 categorías diagnósticas:

Categoría	Diagnostico histopatológico
1	<p>Pénfigo: 52 casos (36%).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Vulgar: 39 casos (75%).</li><li>• Foliáceo: 10 casos (19.3%).</li><li>• Paraneoplásico: 2 casos (3.8%).</li><li>• Seborreico: 1 caso (1.9%).</li></ul>
2	<p>Penfigoide: 27 casos (19%).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ampollosos: 23 casos (85.2%).</li><li>• Gestacional: 1 caso (3.7%).</li><li>• Lineal por IgA: 3 casos (11.1%).</li></ul>
3	<p>Lupus: 18 casos (13%).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Eritematoso sistémico: 11 casos (61.1%).</li><li>• Discoide: 7 casos (38.9%).</li></ul>
4	<p>Otros: 45 casos (32%).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Procesos inflamatorios inespecíficos (dermatitis liquenoide, por contacto, de interfase, proceso inflamatorio agudo y crónico, etc.)</li></ul>

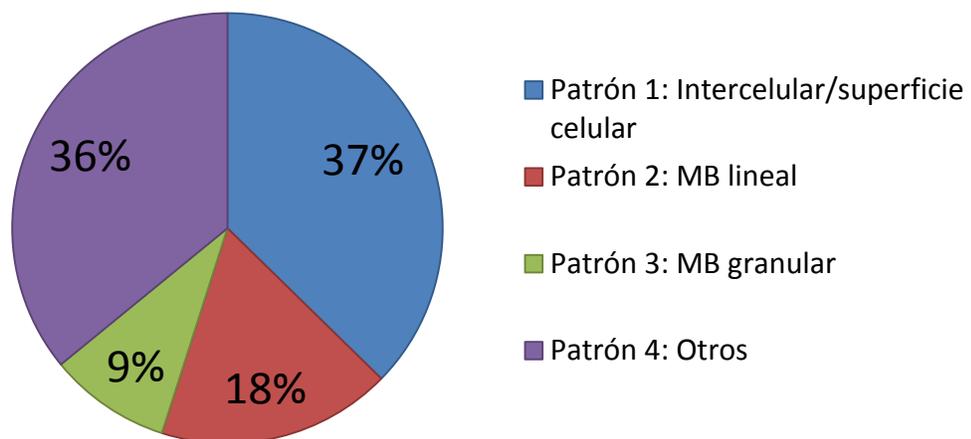
Tabla. 2.- División por categorías de acuerdo al diagnóstico histopatológico.



Gráfica. 1.- Porcentaje por categoría diagnóstica en el estudio de H&E.

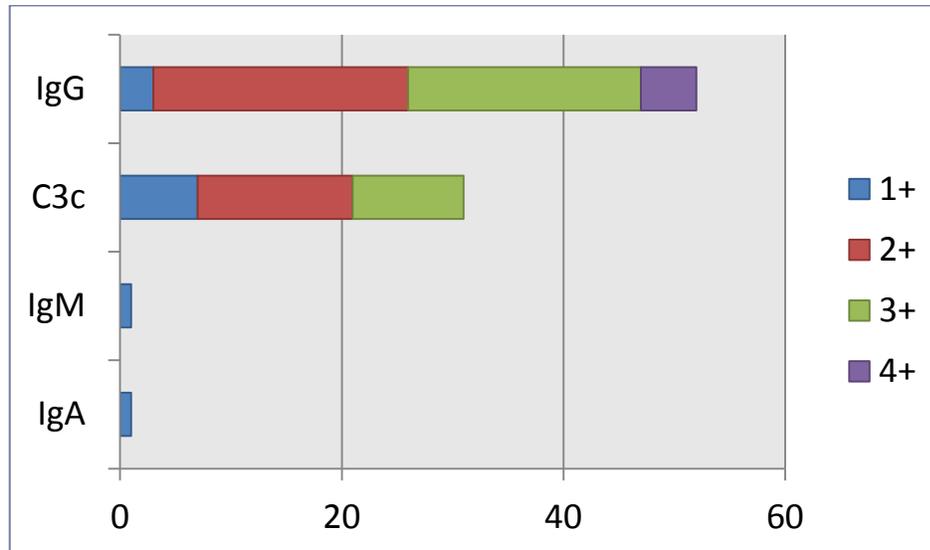
91 casos resultaron positivos en el estudio de inmunofluorescencia (64.08 %) y 51 resultaron negativos (35.92 %).

Los casos positivos para el estudio de IF directa fueron divididos en 4 patrones de expresión.



Gráfica. 2.- Porcentaje de acuerdo al patrón de positividad en el estudio de IF.

De los 53 casos clasificados como patrón intercelular/superficie celular, el 100% presento positividad para IgG (1-4 cruces) y 32 casos (60.4 %) presentaron positividad para C3c (1-3 cruces).



Gráfica. 3.- Patrón de expresión intercelular/superficie celular e intensidad en el estudio de IF directa.

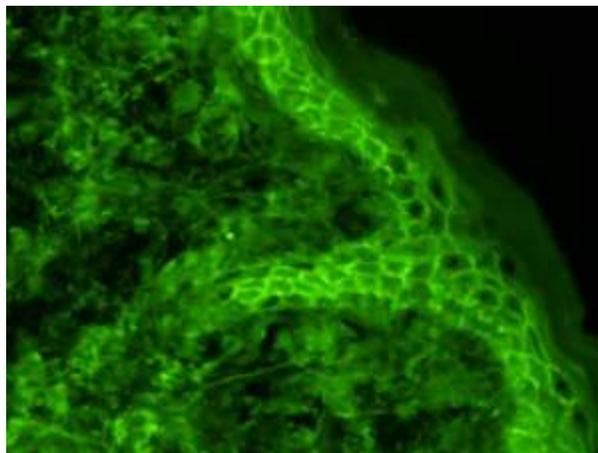
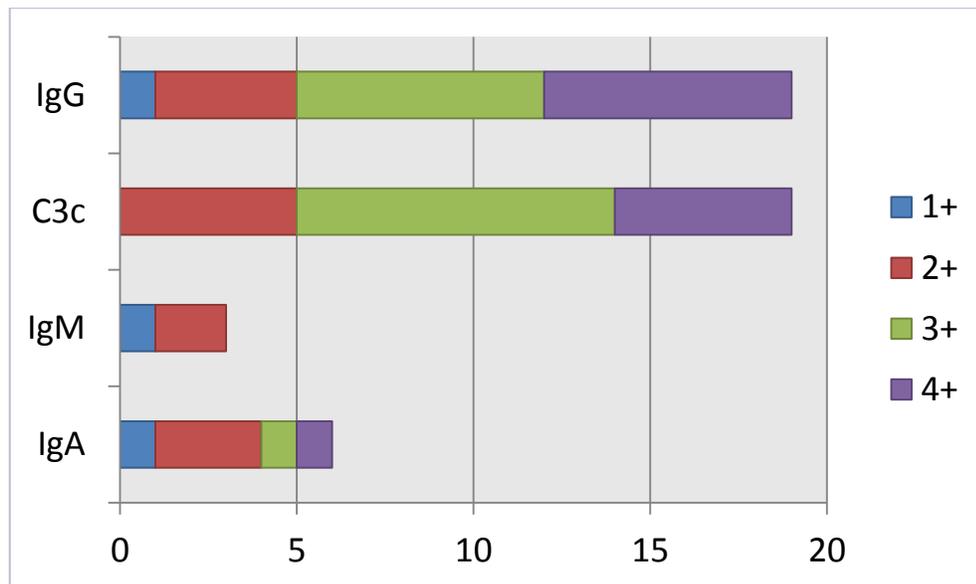


Fig. 16.- Positividad para IgG (3+) en patrón intercelular/superficie celular.

25 casos fueron incluidos en la categoría de patrón lineal en membrana basal, de los cuales 19 (76 %) resultaron positivos para IgG (1-4 cruces) y C3c (2-4 cruces). 3 de nuestros casos presentaron de forma predominante depósitos de IgA en forma lineal a nivel de la membrana basal (Dermatitis lineal por IgA).



Gráfica. 4.- Patrón de expresión lineal en membrana basal e intensidad en el estudio de IF.

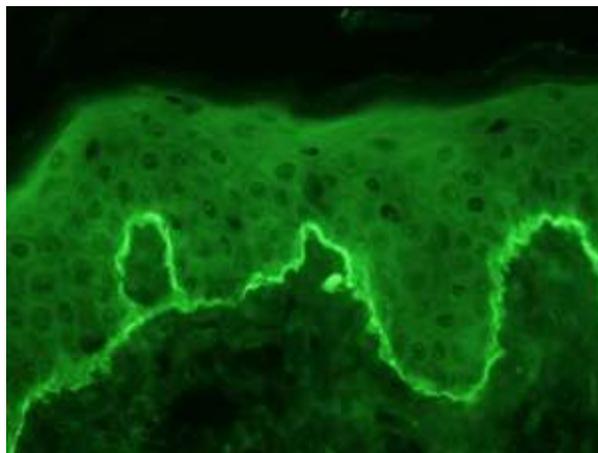


Fig. 17.- Positividad para IgG (4+) en patrón lineal en membrana basal.

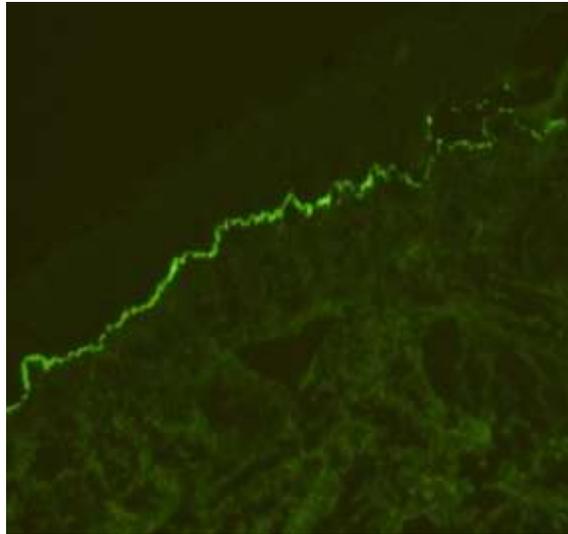
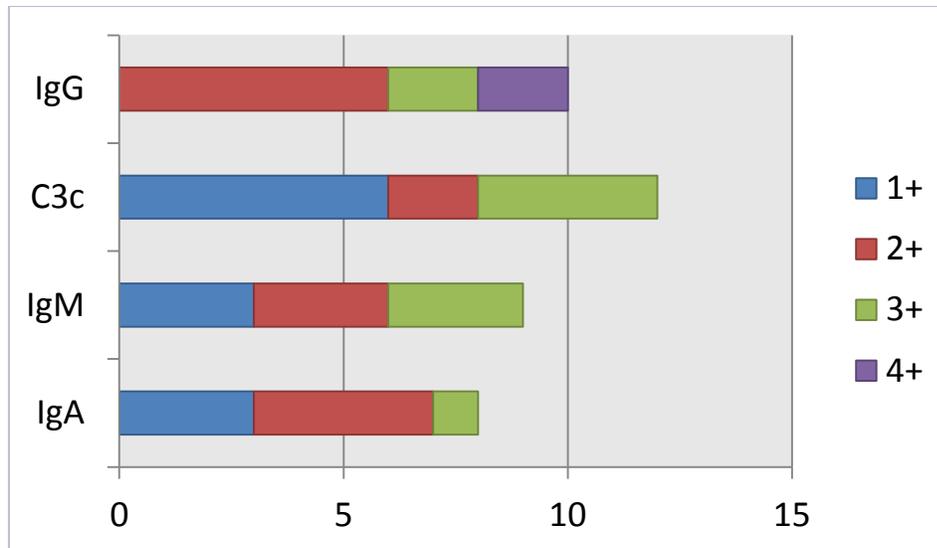


Fig. 18.- Positividad para IgA (3+) en patrón lineal en membrana basal.

En uno de los casos con diagnóstico de penfigoide gestacional solo se observaron depósitos de IgM (1+) y C3c (3+) en patrón granular a nivel de la membrana basal. Otro de los casos mostro un patrón intercelular para IgG y C3c (2+). En dichos casos se realizo una búsqueda en el expediente clínico; en el primer caso no se conto con la información debido a la ausencia del expediente y en el segundo, no se observo mejoría clínica asociado a falta de seguimiento en el tratamiento médico por parte del paciente.

De los 13 casos catalogados como patrón granular en membrana basal, 10 (76.9 %) mostraron depósitos de IgG (2-4 cruces), 9 casos (69.2 %) de IgM (1-3 cruces), 8 (61.5 %) de IgA (1-3 cruces) y 12 (92.3 %) de C3c (1-3 cruces).



Gráfica. 5.- Patrón de expresión granular en membrana basal e intensidad en el estudio de IF.

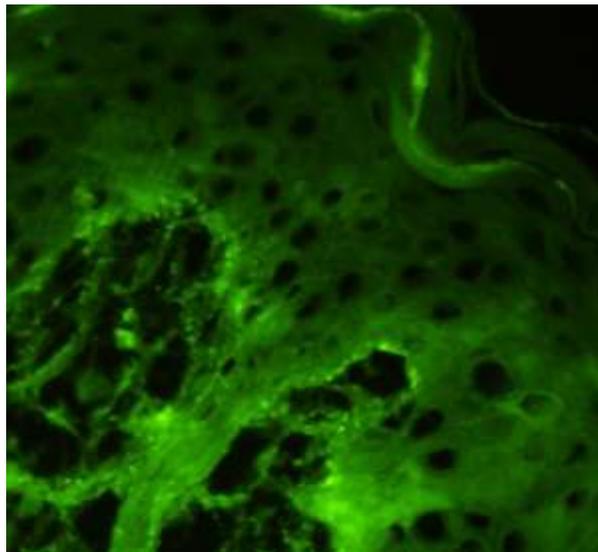
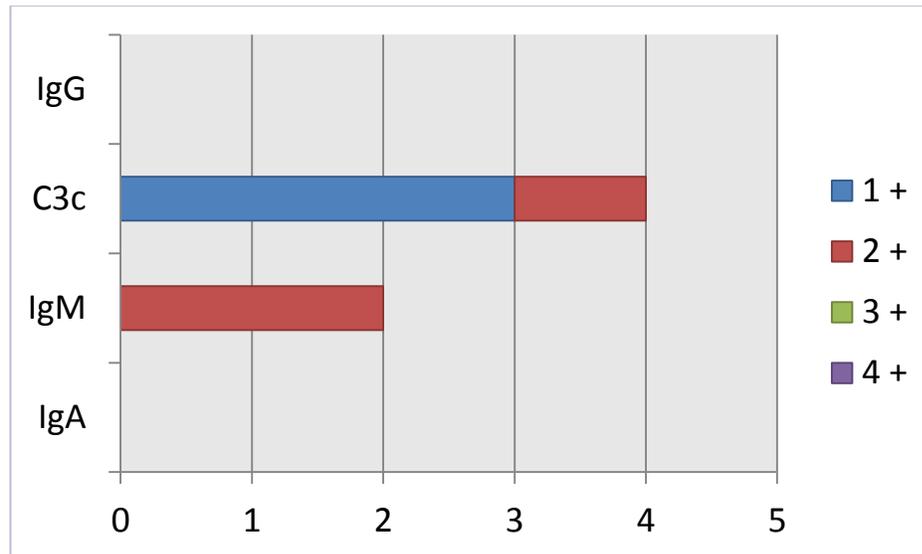


Fig. 19.- Positividad para IgG (3+) en patrón granular en membrana basal.

De los 51 casos agrupados en la categoría de otros diagnósticos, 1 caso (2 %) mostro positividad para IgM en cuerpos citoides (2 cruces), 1 caso mostro

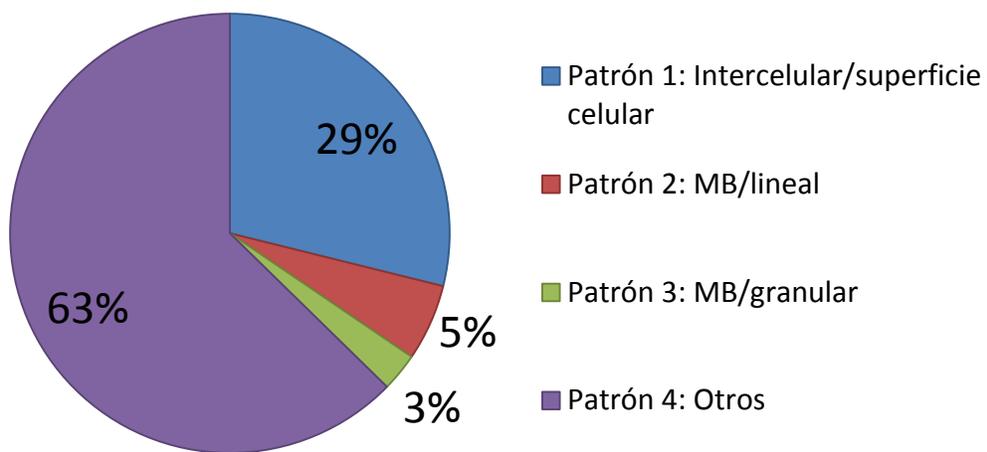
positividad para IgM (2 cruces) y C3c a nivel vascular (1 cruz) y 4 casos para C3c en patrón granular en membrana basal (1-2 cruces).



Gráfica 6.- Casos negativos, con positividad en pared vascular o en cuerpos citoides.

Posteriormente, el total de los casos se dividió de acuerdo al patrón de expresión del marcador de IHQ C4d, en patrón 1 para el depósito intercelular/superficie celular, patrón 2 para el depósito lineal en MB, patrón 3 para el depósito granular en MB y patrón 4 para los casos negativos, con positividad en pared vascular o en cuerpos citoides.

IHQ para Cd4



Gráfica. 7.- Porcentaje de los patrones de positividad en el estudio de IHQ para C4d.

De los 52 casos agrupados en la categoría diagnóstica de pénfigo, 17 (32.7 %) mostraron positividad en patrón intercelular para el marcador C4d (1-3 cruces), 34 casos (65.4 %) fueron negativos y solamente un caso demostró depósito en la pared vascular (1.9 %).

	Patrón intercelular por IF		Patrón intercelular para C4d
	IgG	C3c	C4d
Pénfigo vulgar (39)	100 % (39/39) 1-4 +	61.5 % (24/39) 1-3 +	35.9 % (14/39) 1-3 +
Pénfigo foliáceo (10)	100 % (10/10) 2-4 +	50 % (5/10) 1-3 +	20 % (2/10) 1-2 +
Pénfigo paraneoplásico (2)	100 % (2/2) 2 +	50 % (1/2) 1 +	0 % (0/2) 0 +
Pénfigo seborreico (1)	100 % (1/1) 3 +	100 % (1/1) 3 +	100 % (1/1) 1 +

Tabla. 3.- Tabla comparativa de acuerdo a la categoría diagnóstica de pénfigo: Patrón e intensidad para IgG y C3c por IF y patrón e intensidad en el estudio para C4d por IHQ.

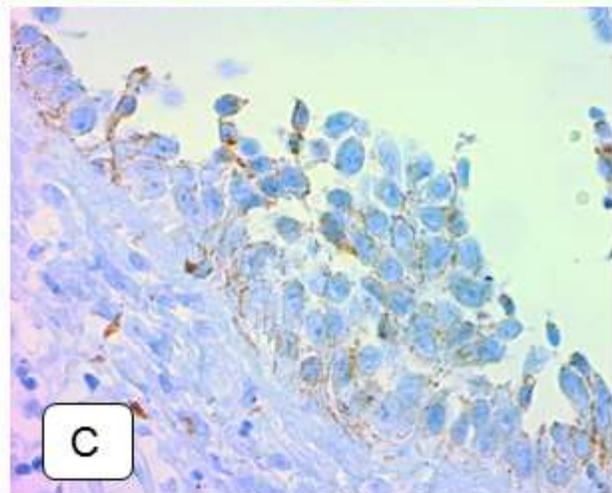
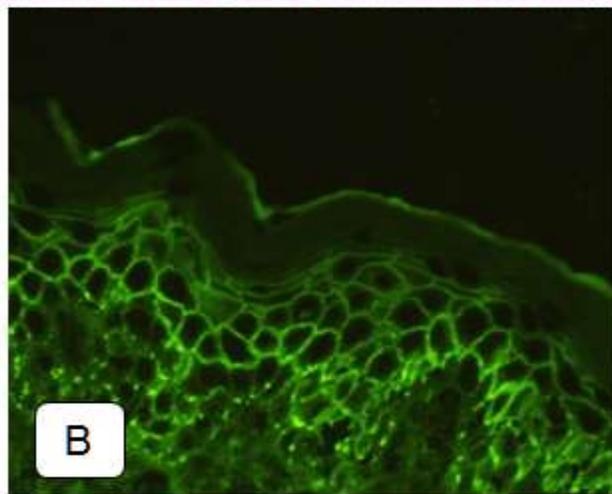
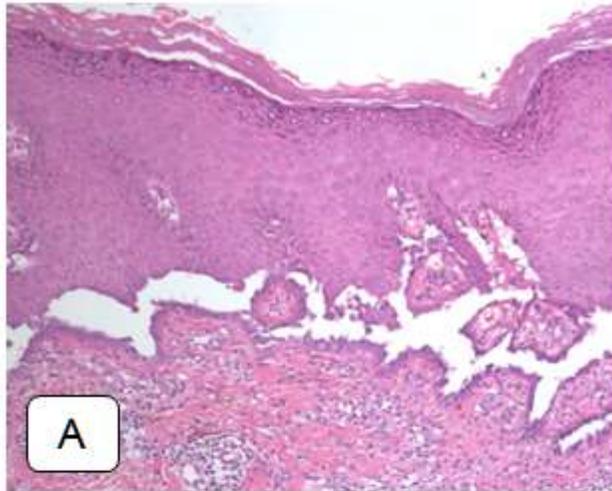


Fig. 20.- Pénfigo: A) Ampolla suprabasal, B) Patrón de IF intercelular para IgG (3+), C) Patrón de depósito intercelular para C4d (3+).

De los 27 casos dentro de la categoría diagnóstica de penfigoide, 8 (29.6 %) presentaron positividad lineal en membrana basal (2-4 cruces) para el marcador C4d, 7 (25.9 %) a nivel intercelular (1-2 cruces) y 12 resultaron negativos (44.4 %).

	Patrón lineal en MB por IF		Patrón lineal en MB para C4d
	IgG, IgA	C3c	C4d
Penfigoide ampollosa (23)	82.6 % (19/23) 1-4 +	82.6 % (19/23) 2-4 +	34.8 % (8/23) 2-4 +
Penfigoide gestacional (1)	0 % (0/1)* 0 +	0 % (0/1)* 0 +	0 % (0/1)* 0 +
Dermatitis lineal por IgA (3)	100 % (3/3) IgA 2-3 +	0 % (0/3) 0 +	0 % (0/3) 0 +

\* El caso con diagnóstico de penfigoide gestacional mostró positividad granular a nivel de membrana basal para IgM (1+) y C3c (3+). Así como positividad intercelular para C4d (2+).

Tabla. 4.- Tabla comparativa de acuerdo a la categoría diagnóstica de penfigoide: Patrón e intensidad para IgG y C3c por IF; y patrón e intensidad en el estudio para C4d por IHQ.

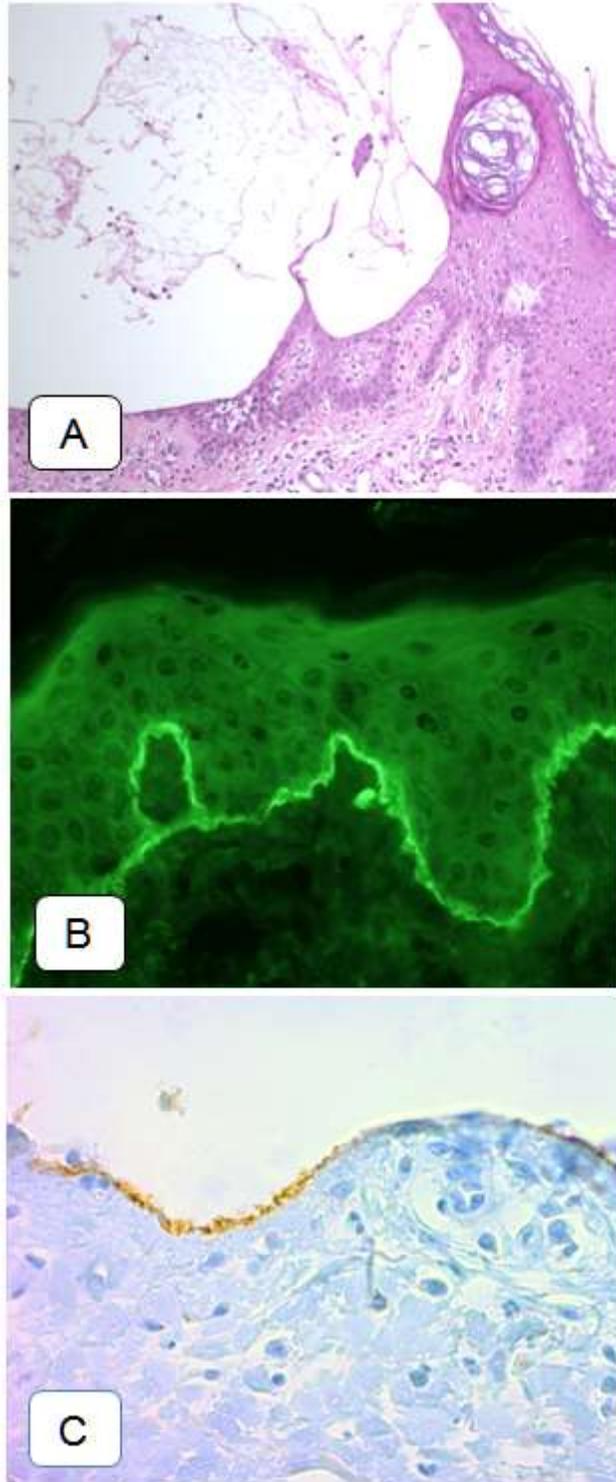


Fig. 21.- Penfigoide: A) Ampolla intraepidermica con escasas células inflamatorias en su interior, B) Patrón de IF lineal a nivel de la membrana basal para IgG (4+), C) Patrón de depósito lineal a nivel de membrana basal para C4d (3+).

De los 18 casos agrupados en la categoría de lupus, 4 (33.3 %) mostraron depósitos granulares a nivel de la membrana basal (1-3 cruces), 4 casos (22.2 %) mostraron depósitos intercelulares (1-2 cruces) y 5 casos resultaron negativos.

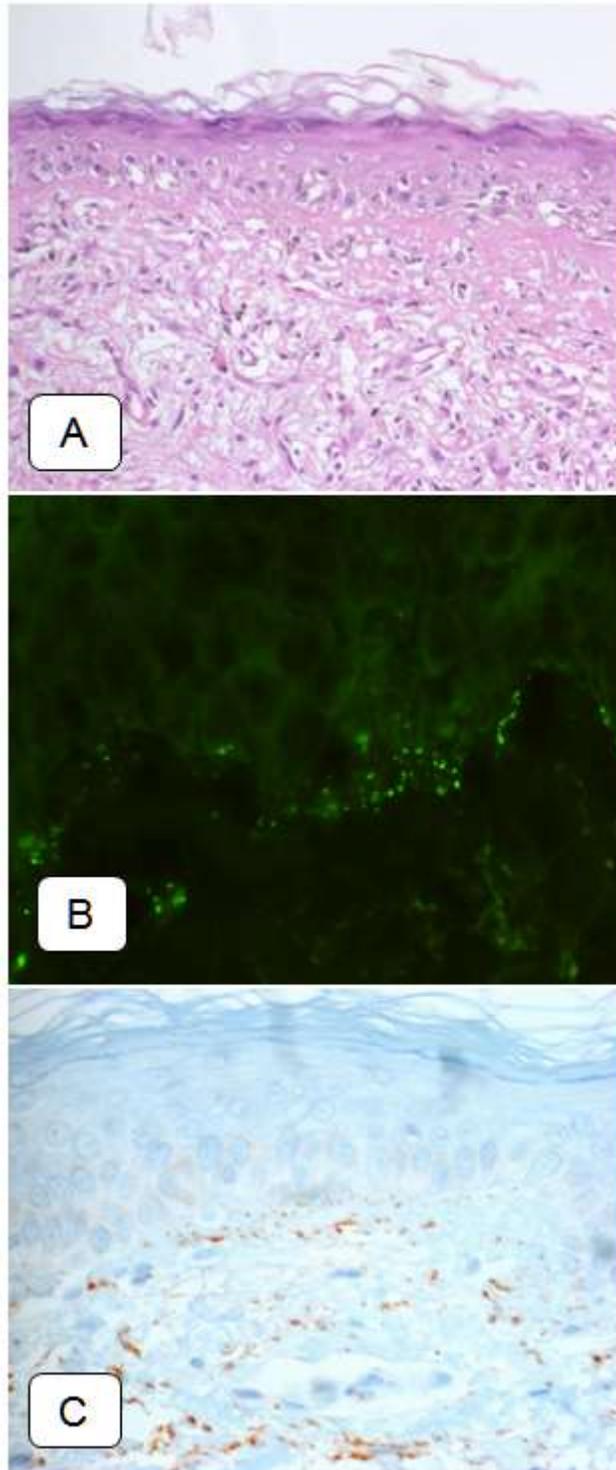


Fig. 19.- Lupus: A) Daño de interfase con vacuolización de la basal, B) Patrón de IF granular a nivel de la membrana basal para IgG (3+), C) Patrón de depósito granular a nivel de la membrana basal para C4d (3+).

	Patrón granular en MB por IF				Patrón granular en MB para C4d
	IgG	IgM	IgA	C3c	C4d
Lupus eritematoso sistémico (11)	72.7 % (8/11)	54.5 % (6/11)	63.6 % (7/11)	72.7 % (8/11)	27.3 % (3/11)  1-3 +
Lupus discoide (7)	28.6 % (2/7)	28.6 % (2/7)	14.3 % (1/7)	42.9 % (3/7)	14.3 % (1/7)  1-3 +
	2-4 +	1-3 +	1-3 +	1-3 +	
	3-4 +	2-3 +	2 +	1-2 +	

Tabla. 5.- Tabla comparativa de acuerdo a la categoría diagnóstica de lupus: Patrón e intensidad para IgG, IgM, IgA y C3c por IF; y patrón e intensidad en el estudio para C4d por IHQ.

De los 45 casos agrupados en la categoría de otros diagnósticos, 37 (82.2 %) resultaron negativos para C4d y 8 (17.8 %) mostraron positividad a nivel intercelular (1-3 cruces).

Dx histológico	Total	IF	C4d
Pénfigo	52	52 (100%) Intercelular/superficie celular	17 (32.7%)
Penfigoide	27	25 (92.6%) MB/lineal	8 (29.6%)
Lupus	18	12 (66.7%) MB/granular	4 (33.3%)
Otros	45	45 (100%) Negativo, inespecífico, vascular o en cuerpos citoides	37 (82.2%) negativo 8 (17.8%) patrón intercelular 1-3+

Tabla. 6.- Tabla de porcentajes de acuerdo a la categoría diagnóstica, patrón de IF y patrón en el estudio para C4d por IHQ.

Así mismo se incluyeron en este grupo aquellos casos que presentaron positividad a nivel de pared vascular y en cuerpos citoides.

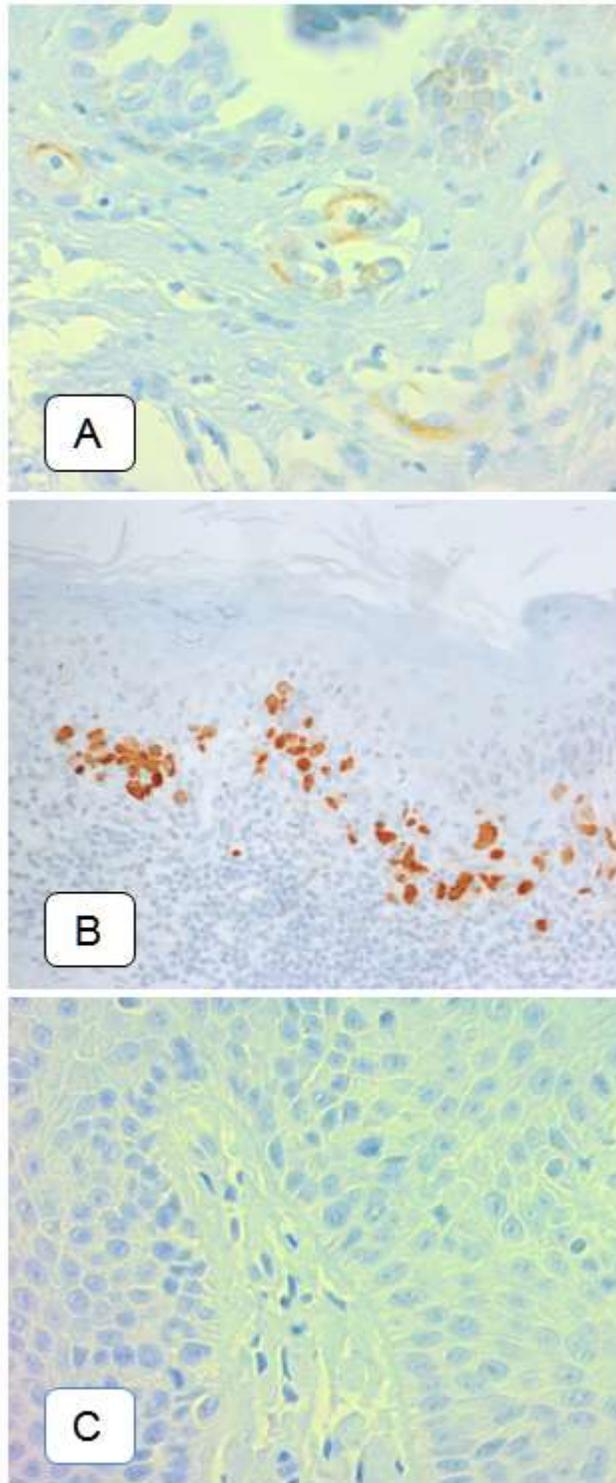


Fig. 23.- Otros diagnósticos: A) Depósito de C4d en pared vascular, B) Depósito de C4d en cuerpos citoides, C) Negativo para depósito de C4d.

## 9. DISCUSIÓN

La activación de la cascada de la vía clásica del complemento lleva a la formación del complejo de ataque a membrana, lo cual puede dañar a las células del huésped, y por lo tanto es importante contar con un mecanismo para el control sobre la convertasa de C3.

Existen ciertos factores plasmáticos que se adhieren a C3b y C4b, convirtiéndolos en sus formas catalíticamente inactivas C3d y C4d. Después de que el daño celular causado por los mecanismos inmunes es reparado, C1q, C3, C4c y el complejo de ataque a membrana desaparecen, pero C3d y C4d permanecen unidos a la superficie en donde ocurrió la activación. Por lo tanto aunque los demás componentes de la cascada del complemento no se encuentren ya unidos al tejido, C3d y C4d permanecen unidos a la célula blanco, estableciéndose como un marcador de la activación del complemento.

El uso de la fracción C4d del complemento ya es conocido en el escenario del rechazo humoral en el injerto de órganos sólidos (ej. hígado, corazón, pulmón, riñón). Su uso en las entidades autoinmunes en dermatopatología aun es reciente y la comparación o correlación con los estudios de inmunofluorescencia es importante para llegar a establecer su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

Nuestros resultados mostraron una correlación del 100 % entre el diagnóstico histopatológico y el patrón de expresión intercelular/superficie celular de inmunofluorescencia directa en los 52 casos con diagnóstico de Pénfigo y sus variedades.

En los 27 casos agrupados en la categoría diagnóstica de Penfigoide, se obtuvo una correlación del 92.6 %, entre el diagnóstico histopatológico y el estudio de inmunofluorescencia; solamente un caso presentó positividad a nivel intercelular para IgG y C3c; otro de los casos demostró solamente depósitos granulares a nivel de membrana basal para IgM y C3c. En dichos casos se realizó una búsqueda en el expediente clínico; en el primer caso no se contó con la información debido a la ausencia del expediente y en el segundo, no se observó mejoría clínica asociada a falta de seguimiento en el tratamiento médico por parte del paciente.

En los 18 casos con diagnóstico histopatológico de lupus eritematoso sistémico y discoide, se observó una correlación del 66.7 %, entre el diagnóstico histopatológico y el patrón de expresión granular en membrana basal. El 33.3 % restante no presentó depósito de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) o C3c.

De los 45 casos agrupados en la categoría de otros diagnósticos; estos mostraron negatividad para depósito de inmunoglobulinas o C3c en el 88.9 %; en 4 (8.9 %) casos se observó depósito de C3c granular a nivel de la membrana basal y un caso (2.2 %) mostró depósito de IgM y C3c a nivel vascular.

Recientemente se han realizado estudios utilizando el marcador de IHQ C4d en enfermedades cutáneas de carácter inflamatorio, muchas de ellas en entidades con una base autoinmunitaria, sin embargo, la cantidad de estudios aun son muy escasos.

Nuestros datos mostraron que el marcador C4d se expresó en patrón intercelular/superficie celular en 17 (32.7 %) de los 52 casos agrupados en la categoría de pénfigo, de los cuales 14 fueron pénfigos vulgares, 2 foliáceos y 1 seborreico. En contraste con los resultados obtenidos en un estudio realizado por Cynthia M. Magro y col **(6)**, en donde de los 11 casos con diagnóstico de pénfigo vulgar, el 82 % presentó depósitos intercelulares para C4d, correlacionando en un 100 % con la expresión para IgG en el estudio de IF directa.

De los 23 casos con diagnóstico de pénfigoide ampuloso, 8 (34.8 %) presentaron positividad para C4d (2-4 +) en forma lineal en MB. Este resultado difiere con el estudio publicado por Eun Ji Kwon **(18)** en el cual más del 80 % de sus casos con diagnóstico de pénfigoide ampuloso mostraron positividad para C4d en patrón lineal de MB; sin embargo, en el estudio publicado por Cynthia M. Magro y col **(6)**, solamente 4 (23.5 %) de 17 casos con diagnóstico de pénfigoide ampuloso mostraron positividad lineal en MB para C4d.

Los casos diagnosticados como pénfigoide gestacional y dermatitis lineal por IgA resultaron negativos para la tinción con C4d. Debido a que el pénfigoide gestacional es una enfermedad ampulosa mediada por auto anticuerpos y que se activa mediante la vía clásica el complemento, es de esperarse que C4d se encuentre positivo en patrón lineal en la MB, sin embargo, nuestro caso resultó positivo en un patrón intercelular; así mismo, la IF mostró un patrón granular en MB para IgM y C3c. Esto contrasta con el trabajo realizado por Eun Ji Kwon y col **(18)**, en el cual se incluyeron 8 casos de pénfigoide gestacional, resultando

en el 100 % de los casos positividad lineal en MB para C4d, correlacionando al 100 % con la expresión de IgG y C3c por IF.

Los 18 casos en la categoría diagnóstica de lupus, 4 (33.3 %) mostraron positividad para C4d en patrón granular en MB. Contrastando con el trabajo de Cynthia M. Magro y col **(6)**, en donde el 100 % de sus casos con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (5/5) mostraron un patrón granular en MB para C4d, correlacionando con el estudio de IF el cual resultó positivo en forma granular a nivel de MB.

## 10. CONCLUSIONES

El espectro de enfermedades cutáneas de carácter inmunológico representa un reto diagnóstico debido a que muchas de ellas comparten características histopatológicas.

Debido a esto en la mayoría de los casos el conocimiento del cuadro clínico, exploración física, marcadores serológicos y el uso de técnicas especiales como la inmunofluorescencia son de vital importancia para llegar a un diagnóstico certero.

No obstante, no siempre es posible contar con la infraestructura necesaria, como: microscopio de fluorescencia, criostato, medio de transporte, biopsia en fresco y/o congelado o con el personal capacitado para su valoración.

Nuestros casos mostraron una buena correlación entre el diagnóstico histopatológico y el patrón de expresión de la inmunofluorescencia, observándose una correlación hasta el 100 % en los casos agrupados en la categoría de pénfigo, y hasta un 66.7 % para los casos con diagnóstico de lupus. Esto demuestra que el estudio de inmunofluorescencia sigue siendo el Gold estándar para el abordaje de biopsias cutáneas con diagnóstico de enfermedad autoinmune (variantes de pénfigo y de penfigoide) y enfermedades de la colágena (lupus eritematoso y discoide).

En la literatura se ha demostrado la presencia de C4d en enfermedades cutáneas y renales de carácter auto inmunitario, sugiriendo su utilidad diagnóstica en la identificación de complejos inmunes en enfermedades como

glomerulonefritis membranosa, nefropatía por IgA, LES, pénfigo y penfigoide ampolloso.

Los datos obtenidos al correlacionar el patrón e intensidad del marcador de inmunohistoquímica C4d con el patrón e intensidad del estudio de inmunofluorescencia directa, difieren con la escasa literatura que se encuentra publicada **(6,18-19)**.

Nuestros resultados sugieren que el marcador C4d es un marcador poco sensible y específico en el diagnóstico de enfermedades cutáneas de carácter autoinmunitario. A sí mismo, la positividad en patrón intercelular/superficie celular en cuadros inflamatorios inespecíficos despierta la preocupación de un posible resultado falso positivo.

Debido a que la cantidad de artículos publicados y a que la experiencia en su uso para el diagnóstico de enfermedades cutáneas de carácter inmunológico es muy escasa, aun es necesario la realización de más estudios, en correlación con la técnica de inmunofluorescencia directa, la cual sigue siendo el gold estándar y que como se observó en este estudio, presenta una muy buena correlación con el diagnóstico histopatológico

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Lee Goldman and Andrew I. Schafer. Goldman's Cecil Medicine , Twenty-Fourth Edition. 49, 239-244.
2. Frank MM, Fries LF. The role of complement in defence against bacterial disease. *Baillière's Clin Immunol Allergy* 1988;2:335.
3. *H. Davis Massey, Richard A. McPherson*. Mediators of inflammation: complement, cytokines, and adhesion molecules . Chapter 47, 914-932.e6.
4. Dylan V. Miller, MD; Anja C. Roden, MD; Jeffrey D. Gamez, BS; Henry D. Tazelaar, MD. Detection of C4d Deposition in Cardiac Allografts A Comparative Study of Immunofluorescence and Immunoperoxidase Methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:1679–1684.
5. M. Valente, L. Furian, M. Della Barbera, C. Silvestre, S. Marino et al. Glomerular C4d Immunoreactivity in Acute Rejection Biopsies of Renal Transplant Patients. *Transplantation Proceedings*, 44, 1897–1900 (2012).
6. Cynthia M. Magro, MD, and Molly E. Dyrsen, MD. The use of C3d and C4d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue as a diagnostic adjunct in the assessment of inflammatory skin disease. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:822-33.
7. Min-Kyung Kim, Young-In Maeng, Sun-Jae Lee, In Hee Lee et al. Pathogenesis and significance of glomerular C4d deposition in lupus

nephritis: activation of classical and lectin pathways. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(10):2157-2167.

8. Mario Espinosa-Hernández, Rosa Ortega-Salas, María López-Andreu. C4d as a diagnostic tool in membranous nephropathy. *Nefrologia* 2012;32(3):295-9.
9. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes. *J Immunol* 1997;158:4525.
10. Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, et al. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:29–35.
11. Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol* 2007;44:3875–88.
12. Vorup-Jensen T, Jensenius JC, Thiel S. MASP-2, the C3 convertase generating protease of the MBLectin complement activating pathway. *Immunobiology* 1998;199:348.
13. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med* 1995;1:237.
14. Korman N.J.: Pemphigus. *Dermatol Clin* 1990; 8: pp. 689-700.

15. Becker B.A., and Gaspari A.A.: Pemphigus vulgaris and vegetans. Dermatol Clin 1993; 11: pp. 429-452.
16. Krain I.S.: Pemphigus: epidemiologic and survival characteristics of 59 patients. Arch Dermatol 1974; 110: pp. 862-865.
17. Meurer M., Millns J.L., Rogers R.S., et al: Oral pemphigus vulgaris. A report of ten cases. Arch Dermatol 1977; 113: pp. 1520-1524.
18. Eun Ji Kwon, MD,\*† Peter Ntiamoah, MPH,\* and Kenneth J. Shulman, MD. The Utility of C4d Immunohistochemistry on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue in the Distinction of Polymorphic Eruption of Pregnancy From Pemphigoid Gestationis. Am J Dermatopathol \_ Volume 0, Number 0, Month 2013.
19. Wells Chandler, MD, John Zone, MD and Scott Florell, MD. C4d immunohistochemical stain is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in bullous pemphigoid . J Cutan Pathol 2009; 36: 655–659.

