

# Diagnóstico inmunohistoquímico de dermatosis inmunomediadas en perros domésticos

## Immunohistochemical diagnosis of immune-mediated dermatoses in domestic dogs

Mario Adán Bedolla Alva\* Gerardo Salas Garrido\* Fernando Constantino Casas\*

---

### Abstract

A retrospective study of 28 dogs skin samples was carried out between 2001 and 2004. The fixed paraffin-embedded tissues showed microscopic lesions and suggestive diagnoses of pemphigus or lupus erythematosus (LE). The samples were re-evaluated by immunohistochemistry to identify intratissular deposits of canine IgG. Only 57.14% (16 cases) were positive. The location of IgG in the interstice space of the epidermis or in the basal membrane was helpful to differentiate between pemphigus and lupus erythematosus and among the different forms of pemphigus. From the positive cases 50% (eight cases) were consistent with pemphigus foliaceus, 31.25% (five cases) with pemphigus vulgaris, 12.5% (two cases) with pemphigus erythematosus, and 6.25% (one case) with lupus erythematosus. Immunohistochemistry is a valuable diagnostic tool for the definite diagnosis of immune mediated diseases such as pemphigus and lupus erythematosus. The aim of the present study was to demonstrate the usefulness of a never used method in Mexico for the specific diagnosis of pemphigus and lupus erythematosus.

**Key words:** IMMUNOHISTOCHEMISTRY, PEMPHIGUS, LUPUS ERYTHEMATOSUS, DOGS, SKIN.

### Resumen

Se realizó un estudio retrospectivo de 28 casos de perros, cuyas muestras de piel incluidas en parafina (de 2001 a 2004) presentaban lesiones microscópicas y diagnósticos sugerentes a pénfigo o lupus eritematoso (LE). Dichas muestras se reevaluaron mediante inmunohistoquímica, identificando un depósito intercelular de IgG canino. Se obtuvieron reacciones positivas en 57.14% (16 casos) de las muestras procesadas. La distribución de los depósitos intercelulares de IgG en el espacio de la epidermis, así como de la membrana basal, fue de ayuda para diferenciar entre pénfigo y lupus eritematoso y entre las diferentes presentaciones de pénfigo. De los casos positivos, 50% (ocho) fueron consistentes con pénfigo foliáceo, 31.25% (cinco) fueron diagnosticados como pénfigo vulgar, 12.5% (dos) fueron consistentes con pénfigo eritematoso y 6.25% (uno) correspondió a lupus eritematoso. La inmunohistoquímica es una herramienta diagnóstica de gran ayuda para el diagnóstico definitivo de enfermedades inmunomediadas como pénfigo y lupus eritematoso. El objetivo del presente trabajo fue demostrar la utilidad de un método no utilizado anteriormente en México para el diagnóstico específico de pénfigo y lupus eritematoso.

**Palabras clave:** INMUNOHISTOQUÍMICA, PÉNFIGO, LUPUS ERITEMATOSO, PERROS, PIEL.

---

Recibido el 14 de noviembre de 2007 y aceptado el 28 de octubre de 2008.

\* Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

## Introduction

Immune-mediated dermatoses are characterized by auto-antibodies production against skin components and by the formation of antigen-antibody complexes that are deposited in different skin locations.<sup>1</sup>

The most diagnosed are pemphigus and lupus erythematosus (LE). The first is present in approximately 0.6% of all canine dermatoses, while the second represents 0.5%.<sup>2,3</sup>

The diseases which constitute the pemphigus complex are associated with auto-antibodies formation against intercellular union proteins of keratinocytes (desmoglein 1 and 3).<sup>1,4,5</sup>

The pemphigus complex consists of four cutaneous diseases: foliaceus, vulgar, erythematosus and vegetans, that are present in humans, dogs, cats, horses and goats.<sup>2,4</sup>

The pemphigus diagnosis is performed by different methods; in order to differentiate several types of pemphigus it is necessary to know the medical record, perform a physical exam and histopathology of lesions, besides applying immunofluorescence or immunohistochemistry.<sup>1,6</sup>

Pemphigus vulgaris is the serious form and second most common of the pemphigus complex.<sup>1,3</sup> The macroscopic lesions consist of vesicles, erosion and ulcers in oral cavity and around mucous-cutaneous unions. Histological exam of skin shows acantholysis, fissures and vesicles in the suprabasal region of the epidermis. Vesicles contain acantholytic keratinocytes and none or few inflammatory cells; besides, such vesicles exhibit in their basal part a row of basal cells united to the basal membrane (tombstone row cells). The superficial dermis usually has perivascular to lichenoid inflammation composed of lymphocytes, plasmatic cells and macrophages.<sup>1,5</sup>

Pemphigus vegetans is the benign form of pemphigus vulgaris.<sup>1,3</sup> The macroscopic lesions are vesicles, pustules and verrucous vegetations on the trunk. The skin histopathology reveals irregular epidermic hyperplasia, papillomatosis and micro-abscesses which contain numerous eosinophils, scarce neutrophils and acantholytic cells. The superficial dermis inflammation is composed of macrophages, lymphocytes and plasmatic cells.<sup>1,5</sup>

Pemphigus foliaceus is a minor and more common variation of pemphigus complex.<sup>1,3</sup> Macroscopic lesions consist of vesicles or pustules, erosions and scabs, mainly in face (nasal plane and periorbital region). In skin histopathology, acantholysis, vesicles, fissures and sub-corneal region pustules of the epidermis are observed. Pustules contain numerous neutrophils or eosinophils, as well as acantholytic kerati-

## Introducción

Las dermatosis inmunomediadas se caracterizan por la producción de autoanticuerpos contra componentes de la piel y por la formación de complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en diferentes localizaciones de la piel.<sup>1</sup>

Las más diagnosticadas son pénfigo y lupus eritematoso (LE). El primero se presenta aproximadamente en 0.6% de todas las dermatosis caninas, mientras que el segundo representa 0.5%.<sup>2,3</sup>

Las enfermedades que constituyen el complejo pénfigo se asocian con la formación de autoanticuerpos contra proteínas de unión intercelular de queratinocitos (desmogleína 1 y 3).<sup>1,4,5</sup>

El complejo pénfigo consta de cuatro enfermedades cutáneas: foliáceo, vulgar, eritematoso y vegetante, que se presentan en humanos, perros, gatos, caballos y cabras.<sup>2,4</sup>

El diagnóstico de pénfigo se realiza por medio de diferentes métodos; para diferenciar los distintos tipos de pénfigo es necesario conocer la historia clínica, realizar el examen físico y la histopatología de las lesiones, además de aplicar la inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.<sup>1,6</sup>

El pénfigo vulgar es la forma más grave y segunda más común del complejo pénfigo.<sup>1,3</sup> Las lesiones macroscópicas consisten en vesículas, erosiones y úlceras en cavidad oral y alrededor de las uniones mucocutáneas. El examen histológico de la piel muestra acantolisis, hendiduras y vesículas en la región suprabasal de la epidermis. Las vesículas contienen queratinocitos acantolíticos y ninguna o pocas células inflamatorias; además, dichas vesículas exhiben en su parte basal una hilera de células basales unidas a la membrana basal (células en hilera de lápidas). La dermis superficial suele tener inflamación de perivascular a liquenoide compuesta por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.<sup>1,5</sup>

El pénfigo vegetante es la forma benigna de pénfigo vulgar.<sup>1,3</sup> Las lesiones macroscópicas son vesículas, pústulas y vegetaciones verrucosas en el tronco. La histopatología de la piel revela hiperplasia epidérmica irregular, papilomatosis y microabscesos que contienen numerosos eosinófilos, escasos neutrófilos y células acantolíticas. La inflamación en dermis superficial se compone de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.<sup>1,5</sup>

El pénfigo foliáceo es una variante más leve y más común del complejo pénfigo.<sup>1,3</sup> Las lesiones macroscópicas consisten en vesículas o pústulas, erosiones y costras, principalmente en la cara (plano nasal y región periorbitaria). En la histopatología de la piel se aprecia acantolisis, hendiduras, vesículas y pústulas en la región subcorneal de la epidermis. Las pústulas

nocytes. The superficial dermis shows perivascular to lichenoid inflammation composed of macrophages, lymphocytes and plasmatic cells.<sup>1,5</sup>

Pemphigus erythematosus is the third most common form of pemphigus complex.<sup>1,3</sup> The macroscopic lesions are pustules, erosions, scabs and depigmentation in face and ears. Microscopically, skin shows acantholysis and subcorneal pustules; lichenoid inflammation composed by numerous macrophages, lymphocytes, plasmatic cells and scarce neutrophils are observed in the superficial dermis.<sup>1,5</sup>

The immunofluorescence or immunohistochemistry tests become essential to confirm that the disease is part of the pemphigus complex, where immunoglobulin deposits are observed, with or without complement, on the keratinocytes surface.<sup>1,2,4,5</sup> In pemphigus vulgaris and pemphigus vegetans, intercellular deposits of IgG are observed and occasionally complement in the basal part of the epidermis, and histopathological findings help to differentiate them.<sup>7</sup> In pemphigus foliaceus, intercellular deposits of IgG or IgM can be observed, and frequently C<sub>3</sub> in the superficial part of the epidermis.<sup>7</sup> In pemphigus erythematosus, immunoglobulin deposits are observed in the intercellular space of epidermis and basal membrane.<sup>1,5,7</sup>

Two forms of lupus erythematosus exist: systemic lupus erythematosus (SLE), which affects multiple organs and tissues, including skin, and discoid lupus erythematosus (DLE), which affects skin only.<sup>8</sup>

In SLE and DLE skin lesions are similar. Macroscopically they are mainly present in the nose bridge and periorbital region, and consist of erythema, scabs, depigmentation and alopecia. The histological lesions consist of interface dermatitis, composed by histiocytes, lymphocytes and plasmatic cells; hydropic degeneration of basal keratinocytes, pigmentary incontinence, fissure formation or vesicles between dermis and epidermis.<sup>1,5</sup>

With immunofluorescence or immunohistochemistry it is possible to detect IgG, IgA, IgM, or C<sub>3</sub> along the basal membrane of the skin, these deposits confirm what is known as lupus band.<sup>1,3,7,9,10</sup>

Immunofluorescence (IF) is another diagnostic method for these dermatoses, although it is a fast technique, it has its disadvantages with respect to immunohistochemistry (IHC). IF samples must be processed fresh and require frozen cuts in cryostat. IHC samples are conserved in formalin and tissues are processed embedded in paraffin, which allows storage for future studies. By IF, reactions are not permanent. IHC with chromagens like aminoethylcarbazol (AEC), reaction can last for months. For microscopic evaluation of tissue by IF, a special fluorescence microscope is required. IHC uses a conventional microscope.<sup>11</sup>

The aim of the present study was to perform the

contienen numerosos neutrófilos o eosinófilos, así como queratinocitos acantolíticos. La dermis superficial muestra inflamación de perivascular a liquenoide compuesta por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.<sup>1,5</sup>

El pénfigo eritematoso es la tercera forma más común del complejo pénfigo.<sup>1,3</sup> Las lesiones macroscópicas son pústulas, erosiones, costras y despigmentación en cara y orejas. Microscópicamente, la piel muestra acantolisis y pústulas subcorneales, en la dermis superficial se aprecia inflamación liquenoide compuesta por numerosos macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y escasos neutrófilos.<sup>1,5</sup>

Las pruebas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica resultan esenciales para confirmar que la enfermedad es parte del complejo pénfigo, en donde se observa el depósito de inmunoglobulinas, con o sin complemento, sobre la superficie de los queratinocitos.<sup>1,2,4,5</sup> En pénfigo vulgar y pénfigo vegetante se observan depósitos intercelulares de IgG y ocasionalmente complemento en la parte basal de la epidermis, lo que ayuda a diferenciarlos son los hallazgos histopatológicos.<sup>7</sup> En el pénfigo foliáceo se aprecian depósitos intercelulares de IgG o IgM, y frecuentemente C<sub>3</sub> en la parte superficial de la epidermis.<sup>7</sup> En pénfigo eritematoso se observan depósitos de inmunoglobulinas en el espacio intercelular de epidermis y membrana basal.<sup>1,5,7</sup>

Existen dos formas de lupus eritematoso: lupus eritematoso sistémico (LES), que afecta múltiples órganos y tejidos, incluyendo la piel, y el lupus eritematoso discoidal (LED), que afecta únicamente la piel.<sup>8</sup>

En LES y LED las lesiones cutáneas son similares. Macroscópicamente se presentan principalmente en el puente de la nariz y región periorbitaria, y consisten en eritema, costras, despigmentación y alopecia. Las lesiones histológicas consisten en dermatitis de interfase, compuesta por histiocitos, linfocitos y células plasmáticas; hay degeneración hidrópica de los queratinocitos basales, incontinencia pigmentaria, formación de hendiduras o vesículas entre la dermis y epidermis.<sup>1,5</sup>

Con la inmunofluorescencia o inmunohistoquímica es posible detectar IgG, IgA, IgM o C<sub>3</sub> a todo lo largo de la membrana basal de la piel, estos depósitos conforman lo que se denomina banda de lupus.<sup>1,3,7,9,10</sup>

Otro método diagnóstico de estas dermatosis es la inmunofluorescencia (IF), si bien es una técnica rápida, tiene desventajas respecto de la inmunohistoquímica (IHQ); para IF las muestras deben ser procesadas en fresco y requieren cortes por congelación en criostato, en IHQ las muestras se conservan en formol y se procesan los tejidos incluidos en parafina, lo que permite su almacenamiento para reutilizarlos en estudios posteriores. En la IF las reacciones no son permanentes, en la IHQ con cromógenos como el aminoetil-

specific immunohistochemical diagnosis of these dermatoses in domestic dogs, which use has not been previously reported to Mexico.

## Material and methods

In this study, cases belonging to the heritage of the diagnostic service of the Pathology Department of the Veterinary and Husbandry Faculty of the National Autonomous University of Mexico were used.

Twenty eight paraffin-embedded dog skin biopsies with microscopic lesions and suggesting diagnoses of pemphigus or lupus erythematosus, from 2001 to 2004 were selected.

The already paraffin-embedded dog skin biopsies, were cut into 5  $\mu\text{m}$  of thickness in a microtome,\* performing two serial cuts, one stained with hematoxylin and eosin routine technique<sup>12</sup> for its microscopic observation, and the other was processed by immunohistochemistry (IHC).

For IHC technique, a rabbit anti canine anti-IgG polyclonal antibody\*\* at a 1/250 dilution was used. A biotinized secondary antibody anti-rabbit of caprine origin\*\*\* marked with biotin was used, applying 50  $\mu\text{L}$  on the tissue.

The developing substance was prepared with 50  $\mu\text{L}$  from each one of the substances included in the commercial reactive package† [concentrated buffer substrate, cromagen AEC (aminoethylcarbazol) and 0.6% hydrogen peroxide], in 1 mL of distilled water.

For antigen recuperation, 50  $\mu\text{L}$  of pronase at 0.1% (0.05 g of protease‡ + 50 mL of buffered solution) were applied to tissues incubated in humid chamber for 10 minutes in a stove at 37°C. To stop the enzymatic reaction, samples were submerged in PBS performing two changes of five minutes each at room temperature.

a) Positive control: A positive pemphigus foliaceus skin section was used by immunohistochemistry technique (Figures 1 and 2).

b) Negative controls: Two negative controls were used, the first corresponded to the skin section positive to pemphigus foliaceus, to which the primary antibody was changed by PBS (Figure 3). For the second, a healthy skin section was used; to which primary antibody was applied (Figures 4 and 5).

## Results

The immunohistochemical positive reaction was microscopically observed as granular deposit of red brick color, adjacent to the cytoplasm membrane (intercellular spaces) of the different cellular types.

In the histological lesion evaluation of 28 cases, in seven of them, lesions were compatible only with pemphigus foliaceus (25%), three cases suggested

carbazol (AEC) la reacción puede durar meses. Para la evaluación microscópica de tejido en IF se requiere microscopio especial de fluorescencia, en IHQ se utiliza un microscopio de luz convencional.<sup>11</sup>

El objetivo del presente trabajo fue realizar el diagnóstico inmunohistoquímico específico de estas dermatosis en perros domésticos, cuyo uso no se ha informado con anterioridad en México.

## Material y métodos

En este estudio se utilizaron casos pertenecientes al acervo del servicio de diagnóstico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se seleccionaron 28 biopsias de piel de perro incluidas en parafina con lesiones microscópicas y diagnósticos sugerentes a pénfigo o lupus eritematoso, de 2001 a 2004.

Las biopsias de piel de perro, ya incluidas en parafina, se cortaron a 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un microtomo,\* realizando dos cortes seriados, uno de los cuales fue teñido con la técnica de rutina de hematoxilina y eosina<sup>12</sup> para su observación microscópica, y el otro se procesó por inmunohistoquímica (IHQ).

Para la técnica de IHQ se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo Anti-IgG canino\*\* a una dilución 1/250. Se usó un anticuerpo secundario biotinilado anticonejo de origen caprino\*\*\* marcado con biotina, aplicando 50  $\mu\text{L}$  sobre el tejido.

La sustancia reveladora usada se preparó con 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las sustancias incluidas en el paquete de reactivos comerciales† [sustrato de amortiguador concentrado, el cromógeno AEC (aminoetilcarbazol) y 0.6% de peróxido de hidrógeno], en 1 mL de agua destilada.

Para la recuperación de antígenos, se aplicó a los tejidos 50  $\mu\text{L}$  de pronasa a 0.1% (0.05 g de proteasa‡ + 50 mL de solución amortiguadora) incubados en cámara húmeda durante 10 minutos a 37°C en estufa. Para detener esta reacción enzimática, las muestras se sumergieron en PBS realizando dos cambios de cinco minutos cada uno a temperatura ambiente.

a) Testigo positivo: Se utilizó una sección de piel

\*Leica Instruments, Modelo 820, Catálogo 5991006, Nusso-loch, Alemania.

\*\*Biodesign International, Catálogo W991142, Industrial Park Road, Saco Maine, 04071, Estados Unidos de América.

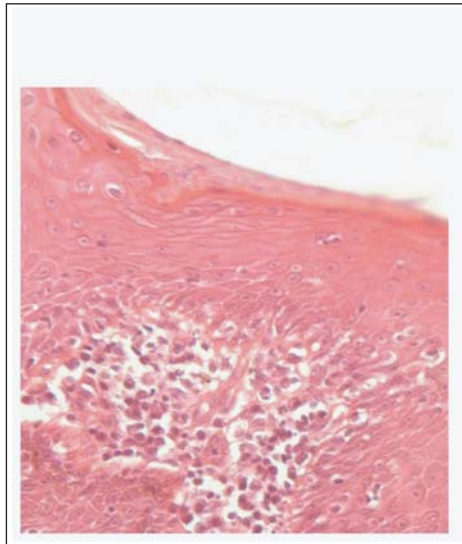
\*\*\*Zymed Laboratorios Inc., Catálogo 95-6143, San Francisco, CA, 94080, Estados Unidos de América.

†Zymed Laboratorios Inc., Catálogo 95-6143, San Francisco, CA, 94080, Estados Unidos de América.

‡Sigma Chemical Co. Cat. P-547, Estados Unidos de América.

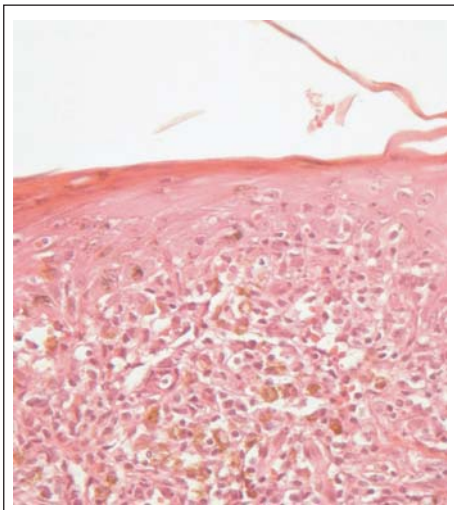
pemphigus vulgaris (10.71%), in ten cases, lesions were compatible with lupus erythematosus (35.71%) and eight shared lesions compatible with lupus and pemphigus (28.57%). By means of this technique, 16 positive cases (57.14%) showed different immunoglobulin distribution.

In eight cases, positive reaction was localized in the intercellular space of the superficial portion of



**Figura 1:** Sección histológica de piel con ligera acantolisis en porción basal de la epidermis e infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en dermis superficial. HE. (40X)

**Figure 1:** Skin histological section with slight acantholysis in basal portion of epidermis and lymphocyte and plasmatic cell infiltrate in superficial dermis. HE. (40X)

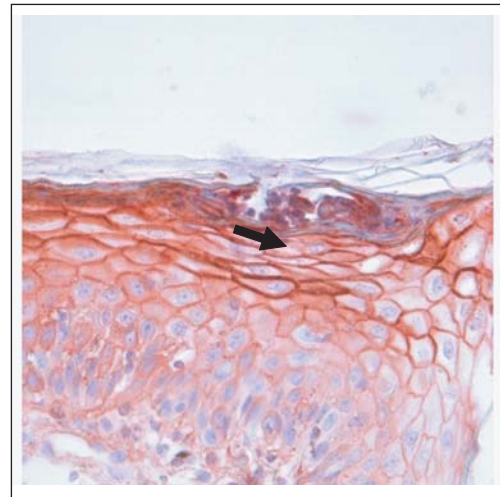


**Figura 3:** Sección histológica de piel, cuya epidermis exhibe acantolisis moderada y exocitosis; la dermis superficial muestra agregados de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, así como incontinencia pigmentaria. HE. (40X)

**Figure 3:** Skin histological section, whose epidermis exhibits moderate acantholysis and exocytosis; superficial dermis shows lymphocytes, plasmatic cells and macrophages, as well as pigmentary incontinence. HE. (40X)

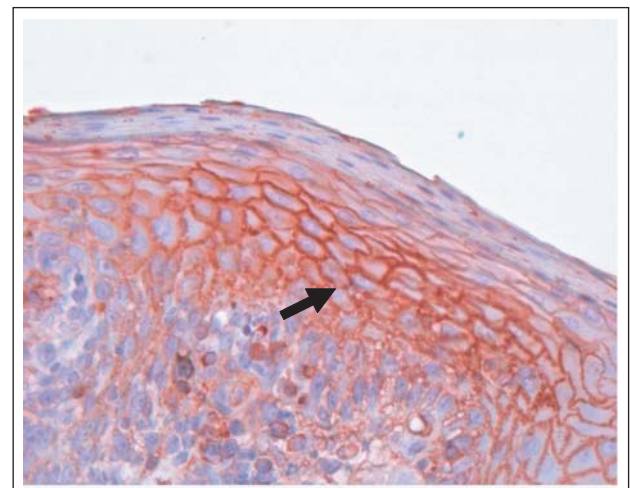
que fue positiva para pénfigo foliáceo a través de la técnica de inmunohistoquímica (Figuras 1 y 2).

b) Testigos negativos Se utilizaron dos testigos negativos, el primero de ellos correspondió a la sección de piel positiva a pénfigo foliáceo por IHQ, a la cual se le cambió el anticuerpo primario por PBS (Figura 3). Para el segundo se utilizó una sección de piel sana, a la cual se le aplicó el anticuerpo primario (Figuras 4 y 5).



**Figura 2:** Sección histológica de piel que muestra inmunopositividad y aspecto granular en el espacio intercelular de la porción superficial de epidermis (flecha). Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40X)

**Figure 2:** Skin histological section that shows immunopositivity and granular aspect in intercellular space of the superficial section of the epidermis (arrow). Immunohistochemical technique (ABC). (40X)



**Figura 4:** Sección histológica de piel que muestra inmunopositividad y aspecto granular en la parte basal de la epidermis (flecha). Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40X)

**Figure 4:** Skin histological section that shows immunopositivity and granular appearance in epidermis basal section (arrow). Histochemical technique. (ABC) (40X)

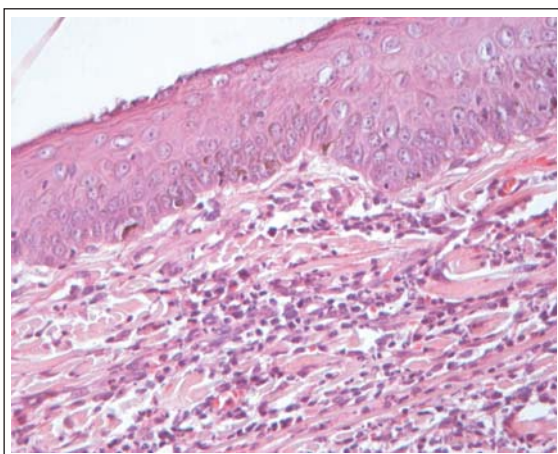
the epidermis (50%), which were consistent with pemphigus foliaceus (Figure 1 and 2); in the intercellular space of the basal portion of the epidermis, this reaction was observed in five cases (31.25%), which were consistent with pemphigus vulgaris (Figure 3 and 4); in the intercellular space and basal membrane of the epidermis it was observed in two cases (12.5%), which correspond to pemphigus erythematosus (Figure 5 and 6); in basal membrane of the epidermis there was only one case (6.25%), consistent with lupus erythematosus (Figure 7 and 8) (Table 1).

## Discussion

According to the results of the immunohistochemical study, 57.14% of cases were positive with this technique using a canine anti-IgG antibody, this percentage is lower than the studies done by Haines *et al.*;<sup>13</sup> nevertheless, Bradley and Calderwood<sup>14</sup> obtained a similar percentage (59%) to the one in this study.

Bradley and Calderwood<sup>14</sup> used canine anti-IgM antibody and observed positive reactions in one case only (4.5%); likewise, Perez *et al.*<sup>15</sup> used a canine anti-IgM in 23 dog skin biopsies and obtained positivity in two cases (8.6%), which suggests that in autoimmune diseases it is convenient to use antibodies against IgG. This is because IgM is considerable during the primary immune response and the quantity of this immunoglobulin is minimal in serum during the secondary immune response with respect to IgG, that predominates.<sup>16</sup>

The skin samples were not evaluated for C<sub>3</sub> detection; nevertheless, C<sub>3</sub> contribution in autoimmune cutaneous diseases is minimal, variable and occurs only in areas with acantholysis and is always accompanied by the presence of IgG or IgM.<sup>17</sup>



**Figura 5:** Sección histológica de piel con infiltrado inflamatorio de interfase compuesto por linfocitos y células plasmáticas. HE. (40X)

**Figure 5:** Skin histological section with interface inflammatory infiltrate composed of lymphocytes and plasmatic cells. HE. (40X)

## Resultados

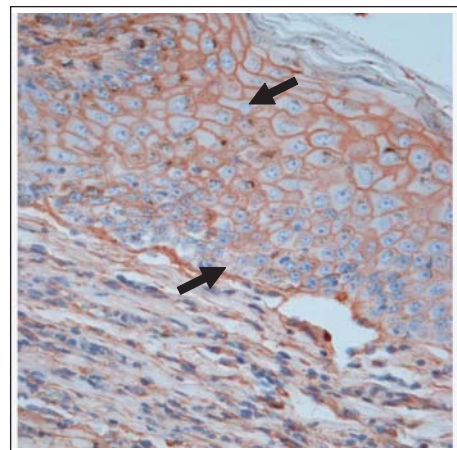
La reacción positiva por inmunohistoquímica se observó microscópicamente como depósito granular, adyacente a la membrana citoplasmática (espacios intercelulares) de los diferentes tipos celulares.

En la evaluación de las lesiones histológicas de los 28 casos, en siete de ellos las lesiones fueron compatibles únicamente con pénfigo foliáceo (25%), en tres casos fueron sugerentes a pénfigo vulgar (10.71%), en diez casos las lesiones fueron compatibles con lupus eritematoso (35.71%) y ocho compartían lesiones compatibles con lupus y pénfigo (28.57%). Mediante esta técnica, 16 casos (57.14%) positivos presentaron una distribución de inmunoglobulinas diferente.

La reacción positiva se localizó en el espacio intercelular de la porción superficial de la epidermis en ocho casos (50%), los cuales fueron consistentes con pénfigo foliáceo (Figuras 1 y 2); en el espacio intercelular de la porción basal de la epidermis esta reacción se observó en cinco casos (31.25%), los cuales fueron consistentes con pénfigo vulgar (Figuras 3 y 4); en el espacio intercelular y membrana basal de la epidermis se observó en dos casos (12.5%), que corresponde a pénfigo eritematoso (Figuras 5 y 6); en la membrana basal de la epidermis se presentó en solamente un caso (6.25%), el cual fue consistente con lupus eritematoso (Figuras 7 y 8) (Cuadro 1).

## Discusión

De acuerdo con los resultados del estudio inmunohistoquímico, 57.14% de los casos fueron positivos con esta técnica utilizando un anticuerpo anti-IgG canino, este porcentaje es menor a los estudios realizados por



**Figura 6:** Sección histológica de piel que exhibe inmunopositividad granular en espacio intercelular de epidermis y membrana basal (flechas). Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40X)

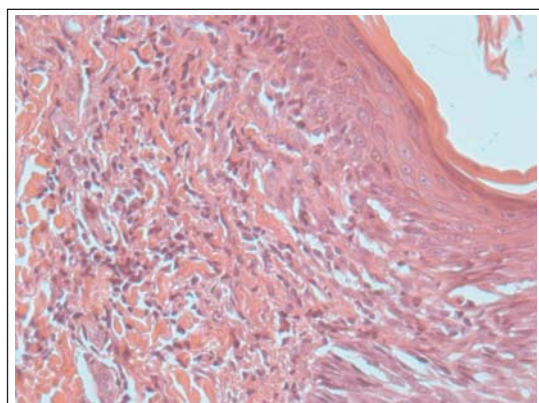
**Figure 6:** Skin histological section which exhibits granular immunopositivity in intercellular space of epidermis and basal membrane (arrows). Immunohistochemical technique (ABC). (40X)

Cuadro 1

NÚMERO DE CASOS Y PORCENTAJE DE LOS DIFERENTES TIPOS DE PÉNFIGO Y LUPUS ERITEMATOSO DIAGNOSTICADOS POR IHQ

NUMBER OF CASES AND PERCENTAGE OF DIFFERENT TYPES OF PEMPHIGUS AND LUPUS ERYTHEMATOSUS DIAGNOSED BY IHC

<i>Disease</i>	<i>Cases</i>	<i>Percentage</i>
Pemphigus foliaceus	8	50
Pemphigus vulgaris	5	31.25
Pemphigus erythematosus	2	12.5
Lupus erythematosus	1	6.25



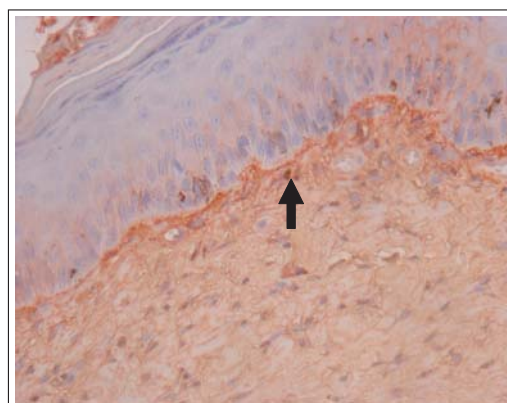
**Figura 7:** Sección histológica de piel con acantolisis moderada en porción basal de epidermis, la dermis superficial tiene agregados de linfocitos y células plasmáticas en dermis superficial. HE. (40X)

**Figure 7:** Skin histological section with moderate acantholysis in basal portion of epidermis, superficial dermis has lymphocytes and plasmatic cells aggregates. HE. (40X).

A critical aspect in the immunohistochemistry technique was the antigenic recuperation, which was carried out by pronase at 0.1%. Treatment of tissue with this enzyme is essential to reestablish the structure of deposited immunoglobulines.<sup>16</sup> Another useful enzyme for this purpose is trypsin at 0.25%.<sup>13,14</sup>

As to the different presentations of pemphigus, literature refers that pemphigus foliaceus is the most numerous, followed by pemphigus vulgaris, pemphigus erythematosus and pemphigus vegetans.<sup>1,4,5,13,14</sup> The aforementioned coincides with the results obtained here, in which pemphigus foliaceus was present in 50% (eight) of the cases, followed by pemphigus vulgaris with 31.25% (five) and 12.5% (two) corresponded to pemphigus erythematosus.

Lupus erythematosus is the second most diagnosed autoimmune skin disease after pemphigus complex.<sup>3</sup> Nevertheless, the number of positive cases recorded



**Figura 8:** Sección histológica de piel que exhibe inmunoposividad granular en la membrana basal (flecha). Técnica de inmunohistoquímica (ABC). (40x)

**Figure 8:** Skin histological section that exhibits granular immunopositivity in basal membrane (arrow). Immunohistochemical technique (ABC). (40x)

Haines *et al.*;<sup>13</sup> sin embargo, Bradley y Calderwood<sup>14</sup> obtuvieron un porcentaje similar (59%) al que se realizó en este estudio.

Bradley y Calderwood<sup>14</sup> usaron un anticuerpo anti-IgM canino y observaron reacciones positivas en un solo caso (4.5%), de la misma manera Pérez *et al.*<sup>15</sup> utilizaron un anticuerpo anti-IgM canino en 23 biopsias de piel de perro y obtuvieron positividad en dos casos (8.6%), lo que sugiere que en enfermedades autoinmunes es conveniente usar anticuerpos contra IgG. Esto se debe a que la IgM es considerable durante la respuesta inmune primaria y es mínima la cantidad de esta inmunoglobulina en el suero durante la respuesta inmune secundaria con respecto a la IgG, que predomina.<sup>16</sup>

Las muestras de piel tampoco fueron evaluadas para la detección de C<sub>3</sub>, no obstante la contribución de C<sub>3</sub> en las enfermedades cutáneas autoinmunes es

here was lower than the referred by Haines *et al.*,<sup>13</sup> Bradley *et al.*<sup>14</sup> and Perez *et al.*<sup>15</sup> As to negative cases, some showed immunoglobulin deposits; however, these were not observed in the intercellular space of the epidermis or in the basal membrane in a characteristic pattern described for pemphigus complex or LE. The factors that may be involved in the negative cases are: inadequate anatomical site to take the sample, the taken of samples from ulcerated skin or with secondary bacterial infection, skin biopsies from patients with immunosuppression therapy history,<sup>14</sup> use of inappropriate fixing solutions or excessive fixing time. In this sense, the ideal solutions to carry out an immunohistochemical study are: paraformaldehyde at 4% or buffered 10% formaldehyde, at 7.4 pH, during 12 to 24 hours;<sup>18</sup> greater fixing time may cause antigen masking due to the presence of interprotein bridges that modify antigen morphology.<sup>19</sup>

It is important to establish that histopathological evaluation of the samples must be performed before subjecting them to immunohistochemistry, to verify that the type of lesions are suggesting immune-mediated dermatosis.<sup>13,14,20</sup> Nevertheless, there are cases where skin histological lesions coincide with diseases that are not autoimmune type; therefore, the immunohistochemical diagnosis represents an indispensable tool for the diagnosis of autoimmune dermatopathies.<sup>2,3,5,8</sup>

The distribution of positive reactions in the intercellular space of the epidermis and basal membrane was useful to differentiate different types of pemphigus and between pemphigus and lupus erythematosus. The intercellular space distribution in the superficial epidermis is a consistent pattern of pemphigus foliaceus. The intercellular space distribution in lower epidermis is consistent with pemphigus vulgaris. In the case of pemphigus erythematosus, the positive reaction is localized in the intercellular space and basal membrane. In lupus erythematosus it is localized in basal membrane.<sup>13,14</sup>

The contribution of this article consists on informing the clinician, that in Mexico, immunohistochemistry can be used for assistance in the accurate diagnosis of pemphigus and lupus erythematosus. In this way, a specific treatment against identified immune dermatopathy can be established, besides, a clinical prognosis between the different types of pemphigus or between pemphigus and lupus erythematosus can be suggested, since these vary in form and severity of disease. Also, this technique can be used for future studies on pemphigus prevalence and each one of its varieties, as well as lupus erythematosus.<sup>1-3,21</sup>

mínima, variable y ocurre sólo en áreas de acantolisis y siempre está acompañada por la presencia de IgG o IgM.<sup>17</sup>

Un aspecto crítico en la técnica de inmunohistoquímica fue la recuperación antigénica, que se efectuó por medio de pronasa a 0.1%. El tratamiento de los tejidos con esta enzima es esencial para restablecer la estructura de las inmunoglobulinas depositadas.<sup>16</sup> Otra enzima útil para este propósito es la tripsina a 0.25%.<sup>13,14</sup>

La literatura refiere que en cuanto a la frecuencia de las diferentes presentaciones de pénfigo, el pénfigo foliáceo es el más numeroso, seguido de pénfigo vulgar, del pénfigo eritematoso de pénfigo vegetante.<sup>1,4,5,13,14</sup> Lo anterior coincide con los resultados obtenidos aquí, en los que se presentó pénfigo foliáceo en 50% de los casos (ocho), seguido de pénfigo vulgar con 31.25% (cinco) y 12.5% (dos) correspondió a pénfigo eritematoso.

El lupus eritematoso es la segunda enfermedad cutánea autoinmune más diagnosticada después del complejo pénfigo.<sup>3</sup> No obstante, el número de casos positivos aquí fue menor al referido por Haines *et al.*<sup>13</sup>, Bradley *et al.*<sup>14</sup> y Pérez *et al.*<sup>15</sup> En cuanto a los casos negativos, algunos mostraron depósitos de inmunoglobulina; sin embargo, no se observaban en el espacio intercelular de la epidermis ni en membrana basal en un patrón característico descrito para el complejo pénfigo o LE. Los factores que pueden estar involucrados en los casos negativos son: selección inapropiada del sitio anatómico para tomar la muestra, la toma de biopsias de piel ulcerada o con infecciones bacterianas secundarias, biopsias de piel de pacientes con antecedentes de terapia inmunosupresora,<sup>14</sup> uso de soluciones fijadoras inapropiadas o excesivo tiempo de fijación. En este sentido, las soluciones ideales para realizar un estudio inmunohistoquímico son: paraformaldehído a 4% o formaldehído a 10% amortiguado, a pH 7.4, durante 12 a 24 horas;<sup>18</sup> mayor tiempo de fijación puede ocasionar enmascaramiento antigénico debido a la presencia de puentes interproteínicos que modifican la morfología del antígeno.<sup>19</sup>

Es importante establecer que se debe realizar una evaluación histopatológica de las muestras, antes de someterlas a inmunohistoquímica, para verificar que el tipo de lesiones son sugerentes a dermatosis inmunomediada.<sup>13,14,20</sup> Sin embargo, hay casos cuyas lesiones histológicas cutáneas coinciden con enfermedades que no son de tipo autoinmune, por lo cual el diagnóstico inmunohistoquímico representa una herramienta indispensable para el diagnóstico de las dermatopatías autoinmunes.<sup>2,3,5,8</sup>

La distribución de las reacciones positivas en el espacio intercelular de la epidermis y membrana basal fue útil para diferenciar los diferentes tipos de pénfigo



## Referencias

1. SCOTT DW, MILLER WH, GRIFFIN CE. Immunologic skin disease In: SCOTT DW, MILLER WH, GRIFFIN CE, editors. Muller and Kirk's small animal dermatology. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995: 556-588.
2. SCOTT DW, WALTON DK, SLATER MR, SMITH CA, LEWIS RM. Immune-mediated dermatosis in domestic animals: Ten years after-Part I. *Comp Cont Educ* 1987; 9: 424-435.
3. SCOTT DW, WALTON DK, SLATER MR, SMITH CA, LEWIS RM. Immune-mediated dermatosis in domestic animals: Ten years after-Part II. *Comp Cont Educ* 1987; 9: 539-551.
4. TIZARD IR. Organ specific autoimmune diseases In: TIZARD IR, editor. *Veterinary immunology. An introduction*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000: 375-377.
5. LEE GT. Superficial pustular diseases of the epidermis en *Veterinary dermatopathology* In: LEE GT, editor. *Veterinary dermatopathology*. St. Louis: Mosby, 1992: 16-20.
6. HURVITZ AI, FELDMAN E. A disease in dogs resembling human pemphigus vulgaris: case reports. *J Am Vet Mec Assoc* 1975; 166: 585-590.
7. YAGER JA, SCOTT DW. The skin appendages In: JUBB KVF, KENNEDY PC, PALMER, N, editors. *Pathology of domestic animals*. Vol. I. 4th ed. New York: Academic Press, 1993: 617-623.
8. LEE GT. Bullous and vesicular diseases of the epidermis and dermal-epidermal junction In: LEE GT, editor. *Veterinary dermatopathology*. St. Louis: Mosby, 1992: 22-33.
9. TIZARD IR. The systemic immunological diseases In: TIZARD IR, editor. *Veterinary immunology. An introduction*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000: 386-390.
10. SCOTT DW, WALTON DK, MANNING TO, SMITH CA, LEWIS RM. Canine lupus erythematosus. I. Systemic lupus erythematosus. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19: 461-479.
11. TIZARD IR. Diagnostic Applications of immunological test In: TIZARD IR, editor. *Veterinary immunology. An introduction*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000: 386-390.
12. HPROPHET EB, MILLS B, ARRINGTON JB, SOBIN L. *Métodos histotecnológicos*. Washington DC: Ed. Registro de patología de los Estados Unidos de América, 1993.
13. HAINES DM, COOKE EM, CLARK EG. Avidin-Biotin-Peroxidase complex immunohistochemistry to detect immunoglobulin in formalin fixed skin biopsies in canine autoimmune skin disease. *Can J Vet Res* 1987; 51: 104-109.
14. BRADLEY GA, CALDERWOOD MB. Immunoperoxidase staining for the detection of autoantibodies in canine autoimmune skin disease; comparison to immunofluorescence results. *Vet Immunol Immunopathol* 1990; 26: 105-113.
15. PEREZ J, ARCE C, MORENO A, MOZOS E, RODRIGUEZ F, LLANES D. Comparison of three monoclonal and three policlonal antibodies in the immunohistochemical diagnosis of canine autoimmune skin diseases. *Vet Dermatol* 2002; 13: 231-236.
16. TIZARD IR. Antibodies: soluble forms of BCR In: TIZARD IR, editor. *Veterinary immunology. An introduction*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000: 139-148.
17. SCOTT DW, MANNING TO, SMITH CA, LEWIS RM. Observations on the immunopathology and therapy of canine pemphigus and pemphigoid. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 48-52.
18. HAROLD E, LANE D. Cell staining. In: HAROLD E, LANE D, editors. *Antibodies a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988: 384-389.
19. RAMOS-VARA JA, KIUPEL M, BASZLER T, BLIVEN L, BRODERSEN B, CHELACK B *et al*. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 2008; 20: 393-413.
20. DAY MJ, HANLON L, POWELL LM. Immune-mediated skin disease in the dog and cat. *J Comp Path* 1993; 109: 395-407.
21. ROSENKRANTZ WS. Pemphigus: current therapy. *Vet Dermatol* 2004; 15: 90-98.

y entre pénfigo y lupus eritematoso. La distribución en el espacio intercelular en la epidermis superficial es un patrón consistente con pénfigo foliáceo. La distribución en el espacio intercelular en la epidermis profunda es consistente con pénfigo vulgar. En el caso de pénfigo eritematoso, la reacción positiva se localiza en el espacio intercelular y membrana basal. En lupus eritematoso se localiza en la membrana basal.<sup>13,14</sup>

La aportación de este artículo consiste en informar al clínico, que en México, puede auxiliarse de la inmunohistoquímica para el diagnóstico certero de pénfigo y lupus eritematoso, debido a que de esta manera podrá establecer un tratamiento específico contra la dermatopatía autoinmune identificada, además podrá sugerir un pronóstico clínico entre los diferentes tipos de pénfigo o entre pénfigo y lupus eritematoso, ya que éstos varían en la forma y severidad de la enfermedad. Además se podrá utilizar esta técnica para posteriores trabajos sobre la prevalencia de pénfigo y cada una de sus variantes, así como de lupus eritematoso.<sup>1-3,21</sup>