

# Inmunofluorescencia en Dermatología

## Su impacto en el diagnóstico dermatológico

Dra. Marian Ulrich +

USA VENEZUELA

Capítulo escrito por la profesora Ulrich en el libro DERMATOLOGIA RONDON LUGO tomo I. aún vigente y con una presentación en power point del Dr Gabriel Fernando Matamoros [matamorosgabomat75@hotmail.com](mailto:matamorosgabomat75@hotmail.com) ,y colaboración de la Dra. Nieves Gonzalez [gonzaleznm@gmail.com](mailto:gonzaleznm@gmail.com)

En 1963 Bumhametal. (1) publicaron el primer artículo sobre la aplicación de Inmunofluorescencia directa al estudio de lesiones de lupus eritematoso (LE) y otras enfermedades dermatológicas. A partir de esa fecha, la detección de anticuerpos, antígenos, inmunocomplejos, componentes del sistema de complemento y otras sustancias mediante el procedimiento de inmunofluorescencia (IF) ha sido de gran utilidad en estudios histopatológicos en dermatología (2-5). La unión química de fluoresceína isotiocianato, rodamina u otros fluorocromos con anticuerpos no altera su capacidad de combinarse con los antígenos. El uso de estos conjugados, usualmente fluoresceinados, proporciona una técnica de alta sensibilidad, comparable a las reacciones que utilizan anticuerpos conjugados con enzimas o radioisótopos. La IF directa, realizada sobre cortes de

tejido, posee la gran ventaja de permitir precisar la localización de la reacción in situ.

La inmunofluorescencia ha sido de importancia en la dermatología por varias razones. El procedimiento proporciona criterios de gran precisión para establecer el diagnóstico diferencial de las enfermedades ampollares, complementarios a las observaciones clínicas y los estudios histopatológicos de rutina. En algunas enfermedades ampollares, la titulación de anticuerpos en muestras seriadas, mediante IF indirecta, permite la evaluación de la actividad clínica y el seguimiento de la respuesta terapéutica.

La evaluación de piel lesionada y piel aparentemente sana contribuye a la clasificación y pronóstico del LE en todas sus manifestaciones, tanto localizadas como sistémicas.

Los procedimientos de IF más utilizados incluyen una tinción directa, en la cual se incuban cortes de tejido lesionado, peri-lesional o aparentemente sano con diversos anticuerpos fluoresceinados para detectar la presencia de diversos isotipos de inmunoglobulinas, complemento y otras sustancias in situ. En el procedimiento indirecto, se aplica el suero del paciente a cortes de un tejido normal apropiado en el primer paso y luego se incuban las preparaciones con el anticuerpo fluoresceinado, para detectar la presencia de anticuerpos en el suero.

Cada uno de estos procedimientos posee ventajas y desventajas. **La gran ventaja** del método directo es que permite la detección in situ de los reactantes, pero la reacción no es cuantitativa; la toma de una biopsia, por pequeña que sea, es algo invasiva; se pueden presentar reacciones falso-positivas por razones técnicas u otros factores (por ejemplo, la toma de muestras de piel expuesta al sol).

La inmunofluorescencia indirecta con el suero del paciente permite realizar estudios cuantitativos y no requiere la toma de biopsias ni las precauciones especiales necesarias para la conservación de las mismas. **La desventaja principal** es la necesidad de utilizar sustratos o tejidos especiales para obtener resultados óptimos, por ejemplo, labio de cobayo, esófago de conejo o de mono u otros muy poco accesibles para la gran mayoría de los laboratorios.

Adicionalmente, puede haber depósitos de inmunoglobulinas u otros inmunoreactantes en la piel en la ausencia de niveles detectables de anticuerpos séricos (por ejemplo, algunos casos de LE discoideo crónico) o anticuerpos que no reaccionan directamente con componentes de la piel (dermatitis herpetiforme, DH).

## **Técnica de la inmunofluorescencia directa**

En nuestro laboratorio, se utiliza el procedimiento descrito a continuación:

Biopsias tomadas con un punch de : 4mm o con bisturí, son llevadas de inmediato al laboratorio. La escogencia del sitio para la toma de la biopsia es de gran importancia en algunos casos; por ejemplo la toma de piel sana no expuesta al sol para la búsqueda de la banda lúpica o la, toma de piel sana adyacente más piel lesionada o piel peri-lesional en las enfermedades ampollares.

En lo posible se toma la biopsia de lesiones relativamente nuevas. Material tomado en otros centros a una distancia de una o dos horas de traslado es colocado sobre una gasa empapada con solución fisiológica y trasladado en un recipiente con hielo. Se ha descrito un medio de transporte {6} que permite preservar la biopsia a temperatura ambiente durante varios días antes de proceder a la congelación. Se cubre la biopsia con el compuesto O.C.T. {Optimum Cutting Temperature Compound; Miles Inc., Elkhart, Indiana, USA} después de orientarla sobre un fragmento de corcho, de manera que salgan la dermis y epidermis en los cortes, y se congela a -202 C para su procesamiento dentro de una semana.

Muchos autores recomiendan un congelamiento rápido en nitrógeno líquido y conservación a -702 C para evitar el deterioro de la muestra. Se hacen cortes a 5 micras en el criostato y se secan las láminas, que llevan cuatro o cinco cortes, al aire durante una hora. Después de un lavado de 10 minutos, se cubren los cortes con el antisuero conjugado apropiado y se incuban en cámara húmeda en la oscuridad durante media hora a temperatura ambiente.

Después de un lavado final de 10 minutos, se coloca una gota de glicerina en solución fisiológica 111 VN y una laminilla sobre el portaobjeto y se examinan las preparaciones en un microscopio con fuente de luz ultravioleta, a un aumento de 160 y de 400 x.

Normalmente hacemos la evaluación preliminar con un antisuero polivalente contra las inmunoglobulinas humanas IgG, A y M, excepto en los Inmunojuorescencia en casos en los cuales se sospecha una patología caracterizada por la presencia de un isotipo específico de inmunoglobulina, por ejemplo, la presencia de anticuerpos del isotipo IgA en dermatitis herpetiforme o en la púrpura de Henoch-Schonlein. La búsqueda del componente C3 de complemento puede ser muy útil en el estudio de vasculitis y de otras dermatosis. Los trabajos de

investigación requieren el uso de una amplia gama de reactivos y procedimientos, por ejemplo, la separación de la epidermis y dermis al nivel de la lámina lúcida mediante el uso de una solución salina hipertónica (7), pero muchos centros carecen de los recursos económicos y de personal para realizar exámenes exhaustivos. De todas maneras, exámenes relativamente sencillos pueden ofrecer un servicio complementario útil en los estudios dermato-histopatológicos.

### **Técnica de inmunofluorescencia indirecta**

La variedad de exámenes que emplean la inmunofluorescencia indirecta es tan amplia que un resumen detallado escaparía de los propósitos de este capítulo. En nuestro instituto, el examen para anticuerpos antinucleares, realizado sobre una impronta de hígado de ratón, fijado con metanol, es utilizado con mucha frecuencia tanto para la evaluación de los colagenosis como para descartar un proceso de patología sistémica autoinmune de base en alopecia, vitiligo, urticaria crónica o púrpura. Se hará referencia a los hallazgos más importantes de IF indirecta en las enfermedades descritas abajo.

Enfermedades de la Piel

Enfermedades dermatológicas con patrones característicos de innumofluorescencia

### **Enfermedades ampollares**

Pénfigo vulgar y pénfigo superficial

(foliáceo y eritematoso) Casi el 100% de estas formas clínicas de pénfigo presenta IF intercelular en la epidermis, en un patrón característico de red o "panal de abeja", al utilizar conjugados contra inmunoglobulina G (IgG) o el componente 3 del sistema de complemento (C3). Muchas veces se observa una sola capa de células rodeadas con fluorescencia adherentes a la membrana basal en lesiones nuevas de pénfigo vulgar, pero en lesiones más viejas se pueden observar varias capas de células. La fluorescencia en piel sana peri-lesional demuestra el mismo patrón, muchas veces con una definición mejor porque el tejido no ha sufrido las alteraciones propias de las ampollas, incluyendo desprendimiento total de la epidermis superior.

Adicionalmente, se observa un precipitado granular en la unión dermoepidérmica en la mayoría de los casos de pénfigo eritematoso, variante que demuestra algunas características similares a LE.

El patrón de IF observado en pruebas indirectas con suero sobre

sustratos adecuados es idéntico a lo descrito arriba y concuerda con una patogénesis autoinmune dirigida contra antígenos intercelulares de la epidermis. La prueba indirecta con suero demuestra buena correlación entre los niveles de anticuerpos e Inmunofluorescencia en enfermedades de la piel respuesta a la terapéutica.

**Penfigoide ampollar.** La IF aplicada a lesiones ampollares y piel sana peri-lesional en penfigoide ampollar demuestra un patrón lineal y continuo en la unión dermoepidérmica (ude) con anti-IgG y anti-C3 en casi el 100% de los casos. La prueba de IF indirecta con suero demuestra el mismo patrón y concuerda con la evidencia de una reacción autoinmune contra antígenos en la lámina lúcida en esta enfermedad. Normalmente los anticuerpos detectados pertenecen a la clase IgG, pero casos de penfigoide ampollar con depósitos lineales de IgA en la ude han sido descritos; algunos autores describen esta entidad como dermatosis ampollar por IgA lineal. La fluorescencia lineal también es observada en pacientes con herpes gestationis (banda de C3 más frecuente que la IgG), y en epidermolisis ampollar adquirida. Dermatitis herpetiforme. En todos los casos de dermatitis herpetiforme se observa un precipitado granular fluorescente en la ude de piel peri-lesional, en el cual predomina la IgA. La fluorescencia granular frecuentemente forma una banda continua, pero con mayor intensidad en las puntas de las papilas dérmicas. Las pruebas indirectas con sueros son negativas para anticuerpos que reaccionan con componentes en la ude.

Enfermedades del tejido conectivo :

**Lupus eritematoso.** Noventa por ciento o más de las lesiones de lupus eritematoso sistémico (LES) y LE discoideo crónico (LEDC) presentan una banda continua o discontinua de fluorescencia granular en la ude. Se observa el mismo patrón en las lesiones ampollares de lupus. En algunos casos se observa fluorescencia sobre los núcleos de la epidermis; igualmente se pueden observar depósitos granulares al nivel de los vasos sanguíneos.

Pruebas indirectas con suero demuestran IF sobre los núcleos de la epidermis en los casos con niveles significativos de anticuerpos antinucleares. Por lo tanto, la IF observada en la ude no refleja una reacción autoinmune contra antígenos presentes en la ude; más bien, inmunocomplejos circulantes se acumulan en la ude debido a la

presión hidrostática al nivel de los vasos capilares cutáneos. Normalmente los anticuerpos predominantes pertenecen a la clase IgG. Se observa el patrón granular de fluorescencia en la piel sana, no expuesta al sol, en aproximadamente el 50% de los casos de LES. Este hallazgo recibe el nombre de la prueba para la banda lúpica ("lupus band test"). La positividad de esta reacción en piel sana ha sido asociada con una frecuencia mayor de nefropatía y otros hallazgos que contribuyen a un pronóstico peor en la enfermedad.

La piel clínicamente sana en LEDC no presenta estos depósitos granulares de IF. Inmunofluorescencia en Enfermedades de la Piel. Se ha observado un patrón moteado, similar al patrón de IF observado en pruebas indirectas. Artritis reumatoidea (AR). Pocos estudios reportan depósitos inmunofluorescentes en la piel de pacientes con AR. Nuestra experiencia es similar a lo observado en esclerodermia; hemos observado fluorescencia sobre los núcleos de la epidermis en algunos pacientes con títulos elevados de MN séricos, sin otros hallazgos importantes.

Recientemente se ha descrito un patrón de IF distinto en LE subagudo, caracterizado por la presencia de fluorescencia granular o particulada en la epidermis inferior y dermis superior (8). Un patrón similar fue observado en piel aparentemente sana, expuesta o no al sol, en los pacientes con LE subagudo.

La presencia de depósitos de inmunoglobulinas en la piel lesionada o clínicamente sana de pacientes con LE no es un criterio útil para seguir la respuesta terapéutica en las diferentes formas de esta enfermedad; dichos depósitos no muestran una buena correlación con la actividad clínica, y pueden persistir durante mucho tiempo en pacientes que reciben esteroides. Igualmente, las pruebas indirectas para anticuerpos antinucleares (AAN) demuestran una correlación limitada con la actividad clínica y la respuesta terapéutica. La literatura presenta discrepancias con respecto a la presencia o ausencia de depósitos de IF granular en síndromes de LE inducidos por medicamentos (por ejemplo, hidralazina o procainamida). En todo caso, los depósitos no persisten por mucho tiempo después de la eliminación del medicamento.

**Esclerodermia y morfea.** La mayoría de los autores reportan IF negativa en la piel lesionada y sana de personas con esclerodermia. En nuestra experiencia, hemos observado IF sobre los núcleos de la

epidermis en un 25% de los pacientes con esclerodermia, reflejo de la presencia de AAN.

### **Otras enfermedades**

Vasculitis. La única forma de vasculitis cutánea que demuestra IF en un alto porcentaje de las biopsias examinadas en nuestro laboratorio ha sido la púrpura de Henoch-Schonlein. El hallazgo más frecuente en esta enfermedad es un depósito granular de IgA en los vasos cutáneos. La presencia de inmunoglobulinas y componentes de complemento ha sido reportada con frecuencia en lesiones nuevas de vasculitis leucocitoclástica; la toma de la muestra en el momento oportuno (con menos de 24 horas de evolución) y la utilización de varios conjugados indudablemente influyen en el éxito en demostrar inmunocomplejos en los procesos de vasculitis.

Para finalizar este capítulo, la Tabla I presenta un resumen de los hallazgos de IF más importantes en enfermedades con compromiso cutáneo.

### **Inmunofluorescencia en Enfermedades de la Piel**

Tabla

Inmunofluorescencia directa en enfermedades dermatológicas

Enfermedad

Patrón características

#### **Enfermedades ampollares**

Pénfigo vulgar y superficial  
yC3.

IF intercelular en la epidennis; IgG

Penfigoíde ampollar

Banda lineal en la ude; IgG y C3.

Herpes gestationís  
frecuente que IgG.

Banda lineal en la ude; C3 más

Epidermolisis ampollar adquirida Banda lineal en la ude; IgG y C3.

Dermatitis herpetiformem

Banda granular en la ude; IgA.

#### **Enfermedades del tejido conectivo**

LES Banda de IF granular en la ude;  
IgG, C3. Positiva en :t 50% de las  
biopsias de piel sana.

LEDC IF granular en la ude; negativa en piel sana.

LE subagudo IF granular en la ude y células de la epidermis

Esclerodermia, morfea, artritis reumatoidea IF sobre los núcleos de la epidermis en algunos casos

Vasculitis IF granular en vasos cutáneos en algunos casos; IgA en púrpura de Henoch-Schonlein.

### **Bibliografía**

- 1) Bumham, T. K., Neblett, T. R., Fine, G. The application of the fluorescent antibody technique to the investigation of lupus erythematosus and various dermatoses. J Invest Dermatol, 1963; 41: 451-6.
- 2) Ullman, S. Immunofluorescence and diseases of the skin. Acta Derm Venereol, 1989; 69 (140): 1-31.
- 3) Helm, K. F., Peters, M. S. Immunodermatology update. The immunologically mediated vesiculobullous diseases, Mayo Clin Proc 1991; 66: 187 -202.
- 4) Vassileva, S. Immunofluorescence in dermatology. Internat J Dermatol, 1993; 32: 153-61.
- 5) Chirinos, M. E., Mandel, S., Oliver, M. Inmunofluorescencia directa en enfermedades de la piel. (Trabajo especial de investigación, Especialista en Dermatología) Universidad Central de Venezuela, 1993.
- 6) Michel, B., Milner, Y., David, K. Preservation of tissue-fixed immunoglobulins in skin biopsies of patients with lupus erythematosus and bullous diseases-preliminary report. J Invest Dermatol, 1972; 59: 449-52.
- 7) Ródenas, J. M., Bhogal, B. S., Black, M. M. Inmunofluorescencia de piel separada en el diagnóstico de enfermedades ampollasas adquiridas. Pie 1992; 7: 508-15.
- 8) David-Bajar, K. M., Bennion, S. D., DeSpain, J. D., Golitz, L. E., Lee, L. A. Clinical, histologic and immunofluorescent distinctions between subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus. J Invest Dermatol, 1992 ; 99: 251-7.