

# Imágenes de microscopía confocal en el diagnóstico de las enfermedades ampollas autoinmunes

Mayor M.C. Marco Antonio Navarro-Balderas,\* Cor. M.C. Rosa Elba Benuto-Aguilar,\*\*  
Cap. 1o M.C. Laura Juárez-Navarrete,\*\*\* Mayor M.C. Dolores Javier Sánchez-González\*\*\*\*

Hospital Central Militar, Unidad de Especialidades Médicas, Escuela Médico Militar. Ciudad de México,  
Hospital Militar Regional de Irapuato, Guanajuato.

## RESUMEN

**Introducción.** La ampolla como lesión elemental puede ser la expresión primaria o secundaria de un gran número de patologías cutáneas; su presencia implica desde el punto de vista evolutivo un fenómeno inflamatorio agudo que puede ser secundario a un traumatismo, un proceso infeccioso, representar la manifestación primaria de una genodermatosis, o bien, constituir un signo cutáneo de enfermedades sistémicas.

**Clasificación.** Existe un grupo de enfermedades ampollas de origen desconocido, en las que se implica en su patogenia el fenómeno de autoinmunidad, que actúa sobre un sustrato específico, ya sea a nivel intraepidérmico, en la unión dermoepidérmica, o bien, en forma subepidérmica. La microscopía confocal constituye una nueva y poderosa herramienta para examinar las estructuras celulares y sus funciones. Pueden observarse tejidos intactos, así como secciones gruesas sin necesidad de hacer cortes histológicos; se obtiene un aumento notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia; reduce el blanqueado de ésta, y permite hacer reconstrucciones tridimensionales.

**Material y método.** Se tomó biopsia cutánea a todos los pacientes de la Consulta Externa de la Unidad de Especialidades Médicas e internados en el Hospital Central Militar con diagnóstico de enfermedades ampollas, en el periodo de mayo del 2003 a abril del 2004. Se realizó técnica de inmunofluorescencia inmunoglobulina de clase G y M.

**Resultados.** De un total de 8,322 consultas, se presentaron seis casos de enfermedades ampollas autoinmunes en la Consulta Externa de Dermatología de la Unidad de Especialidades Médicas, de mayo de 2003 a abril de 2004. Cuatro correspondieron a pénfigo, uno a penfigoide y uno a dermatitis herpetiforme.

**Discusión.** Se calcula la incidencia de las enfermedades autoinmunes en alrededor de 0.5 casos por 100,000 habitantes.

**Palabras clave:** enfermedades ampollas autoinmunes, microscopía confocal, inmunofluorescencia, pénfigo, penfigoide, dermatitis herpetiforme.

## Confocal microscopy images in

## the autoimmune membranous ampulla's illness diagnosis

## ABSTRACT

**Introduction.** The ampulla as a basic injury could be a primary or secondary expression of a great number of skin pathologies; its presence implies, from an evolutionary standpoint of view, an acute inflammatory episode that could be a secondary consequence of a traumatism, an infectious process, represent a genodermatosis in its primary stage, or skin sign of systemic diseases.

**Classification.** There are groups of membranous ampulla's illness whose origin is unknown, and whom imply in its pathogenesis the autoimmunity phenomenon, that acts in a specific substrate, either in the intraepidermic level, at the dermoepidermic union or in a subepidermic form. Confocal microscopy constitutes a new and powerful tool for cellular structures examination as well as its functions. Undamaged tissues and gross sections can be observed without histological cuts; an important magnification with high resolution is obtained, especially in fluorescent sample, reduces the fluorescent whitening, and allows three dimensional reconstructions.

**Material and methods.** A skin biopsy was taken within all external patients from the Medical Specialties Unit and from the hospitalized patients in the Military Central Hospital with a membranous ampulla's illness diagnosis during May 2003 to April 2004 period. G and M immunoglobuline immunofluorescent techniques were applied.

**Results.** Of 8,322 consultations, six cases of ampullous diseases appeared autoimmune in external consulting of Dermatología of Unidad de Especialidades Médicas, from May 2003 to April 2004. Four corresponded to pemphigus, one to pemphigoid and one to herpetiform dermatitis.

**Discussion.** The incidence of the diseases calculates autoimmune in around 0.5 cases by 100,000 inhabitants.

**Key words:** Autoimmune membranous ampulla's illness, confocal microscopy, immunofluorescence, pemphigus, pemphigoid, herpetiform dermatitis.

\* Residente del 3er. año del Curso de Especialización y Residencia en Dermatología de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. \*\* Profesora del Curso de Especialización y Residencia en Dermatología de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. \*\*\* Jefa del Curso de Especialización y Residencia en Dermatología de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. \*\*\*\* Jefe del Laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar.

Correspondencia:

Mayor M.C. Marco Antonio Navarro-Balderas. Correo electrónico: navarromarco@usa.net

Recibido: Octubre 25, 2005.

Aceptado: Diciembre 14, 2005.

## Introducción

En la última década se han descrito nuevas enfermedades ampollas gracias a los enormes avances que proporcionan actualmente los estudios inmunopatológicos, como son la inmunofluorescencia, el inmunoblot, la inmunoprecipitación, entre otros.<sup>1</sup>

Sin embargo, a pesar de todos los avances y nuevos tratamientos, la morbilidad y la mortalidad tanto en los casos agudos como crónicos, sigue siendo considerable, por lo que el diagnóstico preciso es fundamental, y aunque cada padecimiento tiene sus propias características clínicas, en muchos casos su presentación puede ser confusa. Por esta razón es importante considerar los diferentes elementos diagnósticos de una manera práctica en lo referente a las enfermedades ampollas de tipo autoinmune más frecuentes, detallando las características clínicas y orientando en la metodología diagnóstica.<sup>2</sup>

## Clasificación

Las enfermedades que presentan propiamente ampollas como una lesión primaria, se clasifican actualmente en dos grandes grupos (*Cuadros 1 y 2*).<sup>1,2</sup>

Desde el punto de vista histopatológico, las enfermedades ampollas se clasifican dependiendo del lugar en el que se localice la ampolla:

1. Intraepidérmicas.
2. De unión.
3. Subepidérmicas.

## Diagnóstico y fisiopatología de las enfermedades ampollas

Las enfermedades ampollas autoinmunes resultan de la respuesta inmune contra las moléculas de adhesión en la epidermis y la membrana basal.<sup>3</sup>

El grupo de los pénfigos está asociado con anticuerpos contra las proteínas desmosómicas.<sup>4</sup> Los anticuerpos en cada tipo de pénfigo están dirigidos contra una proteína desmosómica o una combinación específica de proteínas desmosómicas (*Cuadro 3*).<sup>4,5</sup>

Existen evidencias experimentales de que los anticuerpos en el pénfigo vulgar (PV) y en el pénfigo foliáceo (PF) causan acantólisis y formación de ampollas por medio de la interferencia directa con la función desmosómica.

Las ampollas subepidérmicas están asociadas contra uno o más componentes de la membrana basal (MB)<sup>6</sup> (*Cuadro 4*). Los anticuerpos en las enfermedades ampollas subepidérmicas inducen la formación de ampollas a través de la activación del proceso inflamatorio.<sup>7</sup>

La especificidad de los hallazgos clínicos en el diagnóstico de las enfermedades ampollas varía. Por ejemplo, ELA<sup>8</sup> puede simular PA y dermatitis herpetiforme (DH). El pénfigo por IgA<sup>9</sup> simula ser de carácter foliáceo (PF), herpetiforme a

**Cuadro 1.** Clasificación de enfermedades ampollas.

|                       |                                     |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Por mutación genética | Predominan en el recién nacido      |
| Autoinmunes           | Adquiridas, predominan en el adulto |

**Cuadro 2.** Dermatitis autoinmunes vesiculoampollas.

| Pénfigos                                            | Penfigoide                        | Otras                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Foliáceo<br>Vulgar<br>Pénfigo IgA<br>Paraneoplásico | Ampolloso (buloso)<br>Cicatricial | Penfigoide gestacional<br>Dermatitis herpetiforme<br>Dermatitis IgA lineal<br>Eritema polimorfo<br>Liquen plano penfigoide<br>Epidermolisis ampollas adquirida |

**Cuadro 3.** Clasificación molecular del pénfigo.

| Tipo de pénfigo | Proteína desmosómica implicada                                                                               |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PV              | Desmogleína 3 (y desmogleína 1)                                                                              |
| PF              | Desmogleína 1                                                                                                |
| PPP             | Desmogleína 3, desmoplaquina 1, desmoplaquina 2, BP 230, envoplaquina, periplaquina, otras no descritas aún. |
| Pénfigo por IgA | Desmocolina 1                                                                                                |

**Cuadro 4.** Clasificación molecular de las enfermedades ampollas subepidérmicas.

| Enfermedad ampollas   | Molécula blanco                                                             |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| PA                    | PA 180, PA 230 (hemidesmosoma y <i>lamina lucida</i> )                      |
| PG                    | PA 180, PA 230 (hemidesmosoma y <i>lamina lucida</i> )                      |
| PC                    | PA 180, laminina V (hemidesmosoma y <i>lamina lucida</i> )                  |
| EAA                   | Colágeno tipo VII (fibras de anclaje)                                       |
| LES AMPOLLOSO         | Colágeno tipo VII (fibras de anclaje)                                       |
| ELA (NIÑOS Y ADULTOS) | Antígeno de la ELA antígeno (AP 180) hemidesmosoma y <i>lamina lucida</i> ) |
| DH                    | Desconocido                                                                 |

la dermatosis pustular subcórnea PPN,<sup>10</sup> simular PV y síndrome de Stevens-Johnson.

La epidermolisis ampollar adquirida (EAA), en su forma inflamatoria, puede ser indistinguible de PA.<sup>11</sup> El penfigoide cicatricial<sup>12</sup> es clínicamente indistinguible de la EAA de las mucosas, ELA y, ocasionalmente, del liquen plano de las mucosas (LP). El lupus eritematoso sistémico ampolloso (LES) puede ser indistinguible de EEA, ELA y PA.<sup>13</sup>

El examen histológico debe ser realizado a partir de una vesícula de formación reciente, que es la que ayuda a descubrir el sitio de formación, presencia, intensidad y tipo de infiltrado inflamatorio y algunos otros hallazgos asociados. El diagnóstico diferencial es realizado con base en la correlación entre los hallazgos histológicos.

### Inmunofluorescencia en las enfermedades ampollasas

La inmunofluorescencia directa (IFD) ayuda a detectar moléculas como las inmunoglobulinas y componentes del complemento en especímenes de biopsia.<sup>14</sup>

El sitio ideal para la toma de la biopsia depende del tipo de enfermedad. Para las enfermedades ampollasas, debe tomarse de la piel perilesional. Los depósitos inmunes son parcial o totalmente degradados en la piel inflamada o con ampollas formadas, y la IFD puede ser falsamente negativa.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es un examen en el cual el suero del paciente sirve para detectar la presencia de algún anticuerpo específico.<sup>14</sup> Este examen ayuda al diagnóstico diferencial entre las diferentes enfermedades ampo-

llasas, y el sustrato que se utiliza incluye piel humana,<sup>15</sup> esófago de mono, labios de puerco de guinea o esófago humano separado con solución salina (SSS).<sup>16</sup>

### Inmunofluorescencia directa

El diagnóstico diferencial de la IFD depende de cuatro hallazgos: el sitio primario del depósito inmune; el número de depósitos inmunes, y si estos son múltiples hay que identificar cuál es el que se deposita en mayor cantidad, y, por último, los depósitos inmunes en sitios secundarios. Distinguiendo estos hallazgos, el diagnóstico se realiza de forma precisa.<sup>17</sup>

La IFD, usando piezas separadas con solución salina (SSS), es un método simple para diferenciar PA de EAA. La incubación del espécimen en solución de 1 mol/L de cloruro de sodio, resulta en la separación de la lámina lúcida. Los depósitos en el PA (y otras formas de penfigoide) están dentro de la *lamina lucida*. De acuerdo a esto, los depósitos inmunes en el penfigoide están en el lado epidérmico de la piel separada, mientras que los depósitos en EAA y del LES ampolloso están presentes del lado dérmico.<sup>16,17</sup>

### Inmunofluorescencia indirecta

La IFI es útil para confirmar un diagnóstico o para diferenciar entre dos enfermedades con hallazgos muy similares. El tipo de inmunoglobulinas circulantes y el sitio en donde se unen dentro de la piel son importantes para el diagnóstico. En la mayoría de las enfermedades ampollasas los anticuerpos circulantes son IgG. La IgA es característica de DH, ELA y Pénfigo por IgA. El sitio donde se unen los anticuerpos son o el espacio intercelular o la membrana basal.<sup>18</sup>

**Cuadro 5.** Algoritmo para el diagnóstico de las enfermedades ampollasas autoinmunes.

| Histopatología                                   | IFD                                                                                                         | IFI                                                                                               | Diagnóstico                                                        |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Suprabasal                                       | 1. IgG ± C3 en EIC<br>2. IgG ± C3 en EIC + MB                                                               | IgG en EIC esófago de mono<br>IgG en EIC, vejiga de rata                                          | PV > PPN<br>PPN                                                    |
| Subcorneal                                       | 1. IgA en EIC<br>2. IgG ± C3 en EIC<br>3. IgG ± C3 en EIC, IgG ± C3 en MB                                   | IgA en EIC<br>IgG en EIC<br>IgG en EIC + ANA                                                      | Pénfigo por IgA<br>PF<br>PE                                        |
| Subepidérmico sin infiltrado inflamatorio        | 1. IgG, C3 ± IgM, IgA en MB<br>2. IgG, IgA ± IgM, C3 en las paredes vasculares                              | 1. Lado dérmico en SSS<br>2. Lado epidérmico en SSS<br>Negativa                                   | EAA<br>PA<br>PCT                                                   |
| Subepidérmico con infiltrado rico en eosinófilos | C3, IgG en BMZ en SSS                                                                                       | Lado epidérmico                                                                                   | PA, PG, PC                                                         |
| Subepidérmico con rico infiltrado en neutrófilos | 1. IgA granular en las papilas dérmicas y MB<br>2. IgA lineal ± C3, MB<br>3. IgG, IgM, C3, IgA, fibrinógeno | Negativo<br><br>1. Lado dérmico en SSS.<br>2. Lado dérmico en SSS y serología positiva para lupus | DH<br><br>ELA<br>EAA, rara en Enf. antiepiléptica<br>LES ampolloso |

±, con o sin; >, más probable.

Existe una superposición en los datos clínicos e histológicos de las diversas enfermedades ampollosas autoinmunes. Un diagnóstico basado únicamente en la clínica o la histología puede no ser exacto. La IFD es extremadamente útil para confirmar un diagnóstico de sospecha y para distinguir enfermedades estrechamente relacionadas.

La IFI es útil en los casos en los que la IFD es negativa o no específica. Asimismo, puede ayudarnos a diferenciar el PA y la EAA. Puede necesitarse sustratos especiales para el diagnóstico de enfermedades ampollosas específicas como el PPN. El *cuadro 5* muestra un algoritmo para el diagnóstico del laboratorio de una enfermedad ampollosa mediante histopatología e inmunofluorescencia.<sup>19</sup> Un diagnóstico exacto ayuda a la elección del tratamiento y al manejo correcto de los pacientes con enfermedades ampollosas.

### Microscopia confocal

En la última década, se han desarrollado procedimientos que permiten incrementar significativamente la resolución del microscopio óptico. Minski, en 1961, propuso un nuevo tipo de microscopio para la observación de especímenes vivos con un alto contraste y mejor resolución, comparable únicamente con la que se obtenía anteriormente con microscopios electrónicos de barrido a bajo aumento o después de complejos procesos de análisis digital de imágenes.

Este nuevo tipo de microscopio se basa en eliminar el velo que, en una imagen de microscopía óptica normal, producen las regiones que se encuentran fuera del plano de foco. Para esto, se ha optado por pasar la luz que incide sobre la muestra por un pequeño agujero o ranura y enfocarla en el plano de la imagen de un objetivo de gran apertura numérica.

De esta manera, la luz que es reflejada por el punto que se encuentra en el plano focal del objetivo, regresa al mismo y es reenfocada y transmitida a su vez por un pequeño agujero o ranura sin ninguna pérdida. En cambio, la luz dispersada o emitida por los puntos que se encuentran fuera del plano de la imagen es atenuada o bloqueada completamente. De esta manera, se obtiene una imagen de alto contraste y definición de un punto en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco.

Debido a que las aperturas tanto de la iluminación como del retorno de la imagen tienen un foco común, se ha denominado este tipo de microscopios como “confocal”. Puede resumirse su función diciendo que la microscopía confocal se basa en mejorar la relación entre la señal y el ruido de la imagen.<sup>20</sup>

La fuente de luz que se utiliza es un rayo láser. El haz de luz se hace pasar por una ranura (P1) e incide con un espejo dicróico (que refleja totalmente la luz que incide con un ángulo de cerca de 45 grados), para posteriormente enfocar sobre la muestra usando el propio objetivo del microscopio. La luz emitida por la muestra es colectada por el mismo objetivo y, pasando a través del espejo dicróico, es enfocada en una ranura detectora (P2).

La luz que penetra a menor o mayor profundidad en la muestra (planos fuera de foco), incide por delante o por detrás de la

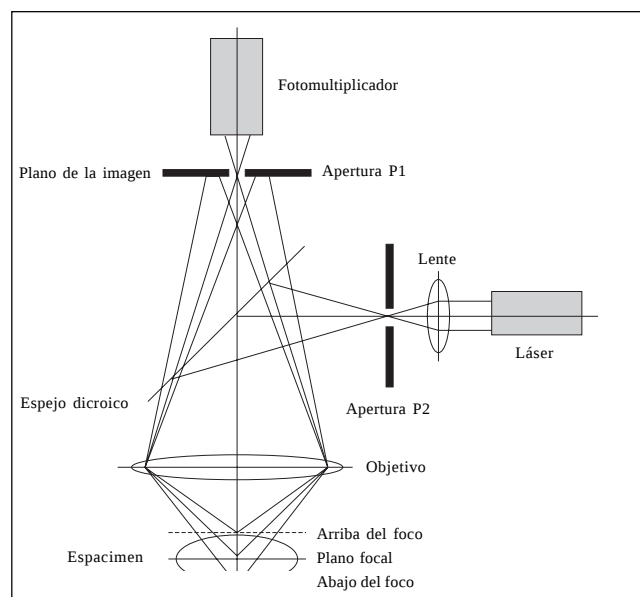
ranura detectora (*Figura 1*). Debido a que la cantidad de luz que incide sobre la muestra es sumamente pequeña, es necesario usar fuentes de iluminación muy poderosas, como es el rayo láser.<sup>21</sup>

La microscopía confocal permite también estudiar los especímenes usando luz transmitida o reflejada, lo cual implica que se puedan estudiar muestras que, por su grosor o por sus características, no son transparentes. Esto ha permitido que se desarrollen nuevas técnicas de preparación de los especímenes a observar, las cuales no implican el corte en rebanadas delgadas como se hacía anteriormente, ampliando así significativamente las posibilidades de estudiar las relaciones estructura-función, ya sea a nivel uni o multicelular.

Se han desarrollado, además de la microscopía confocal, otros métodos que permiten mejorar significativamente la calidad de las imágenes que se obtienen con el microscopio óptico. Estos métodos se basan en el procesamiento digital de imágenes, por medio de procedimientos matemáticos que permiten calcular y eliminar el velo debido a las regiones que se encuentran fuera de foco. Otros métodos para mejorar la calidad de imágenes en la microscopía óptica se basan en modificaciones en los ángulos de incidencia de la luz y en el uso de varios haces de ésta para iluminar las muestras.<sup>20,22</sup>

La importancia de la microscopía confocal radica entonces en que constituye una nueva y poderosa herramienta para examinar las estructuras celulares y sus funciones. Podemos resumir sus ventajas diciendo que:

1. Pueden observarse tejidos intactos, así como secciones gruesas sin necesidad de hacer cortes histológicos.



**Figura 1.** La fuente de luz rayo láser, se hace pasar por una ranura (P1) e incidir con un espejo dicróico. De ahí, se enfoca en la muestra, pasando por el objetivo del microscopio. La luz emitida por la muestra es colectada por el objetivo y se enfoca en una ranura detectora (P2). La luz proveniente de los planos fuera de foco incide fuera de la ranura detectora (líneas punteadas).

2. Se obtiene un aumento notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia.
3. Reduce el blanqueado de la fluorescencia.
4. Permite hacer reconstrucciones tridimensionales más precisas, de mejor calidad y en menor tiempo que por otros métodos.

Por todo lo anterior, es claro que en el corto plazo, el microscopio confocal pasará a formar parte del instrumental normal de trabajo, tanto en laboratorios de análisis clínico-patológicos, como en los laboratorios de investigación básica, ya que se ha convertido en un auxiliar indispensable en los estudios de tipo funcional, en los cuales se pretende determinar los procesos que se llevan a cabo en tejidos vivos.

Como resultado del desarrollo de la microscopia confocal y de los métodos digitales de análisis de imágenes, es posible actualmente abordar cuestiones relativas con las relaciones estructura-función en los seres vivos, que anteriormente eran incontestables.<sup>21,22</sup>

## Pacientes, material y métodos

### Pacientes

Se incluyeron a todos los pacientes de la consulta externa de la Unidad de Especialidades Médicas y hospitalizados en el Hospital Central Militar, con diagnóstico de enfermedades ampollasas, en el periodo de mayo del 2003 a abril del 2004.

### Criterios de Selección

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes de cualquier edad y sexo.
- Diagnóstico de cualquiera de las enfermedades ampollasas.
- Cualquier estadio clínico de la enfermedad que presenten.
- Voluntarios para el estudio.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con diagnóstico de enfermedad ampollasas sin lesiones.
- Pacientes con diferentes diagnósticos de enfermedades ampollasas.
- Que no aceptaran entrar al estudio

Los criterios de eliminación fueron:

- Abandono del estudio por cualquiera causa.
- Que se compruebe otro diagnóstico.

### Material

- Historia clínica completa.
- Laminillas teñidas con hematoxilina y eosina de cada uno de los pacientes de este protocolo de estudio.

- Equipo de pequeña cirugía para realizar biopsia cutánea de las lesiones en pacientes con diagnóstico clínico e histológico de enfermedades ampollasas.
- Tissue tec. Gel de alcohol polivinílico y polietilenglicol, donde se incluyeron las muestras para su congelación.
- Crióstato en donde se congelaran las muestras y se realizó el corte de las mismas.
- Anticuerpos anti-IgM e IgG de suero de conejo y cobayo, respectivamente.
- Microscopio AXIOVERT 200M, marca ZEISS, con unidad confocal; se tomaron las fotografías con la cámara integrada al microscopio HRC-High Resolution Camera KS300.

### Metodología

A los pacientes que presentaron clínicamente enfermedades ampollasas, se les realizó historia clínica dermatológica completa y biopsia cutánea para estudio histopatológico, con tinción de hematoxilina y eosina.

A todos se les realizó biopsia cutánea con diagnóstico clínico y por histología convencional de enfermedades ampollasas en el momento en que presentan lesiones.

La biopsia cutánea se realizó en el quirófano de la Consulta Externa de Dermatología de la Unidad de Especialidad Médicas. La muestra fue transportada en solución salina fisiológica a 0.9% amortiguada con fosfato.

En el crióstato del Departamento de Patología del Hospital Central Militar, se realizó la inclusión en gel de alcohol polivinílico y congelamiento de la pieza a -31 °C. Se almacenaron las piezas a -72 °C en el laboratorio multidisciplinario de la Escuela Médico Militar y Graduados de Sanidad.

En el mes de mayo se realizaron los cortes de las piezas en el crióstato, con un grosor de 6 m. La técnica de inmunofluorescencia se realizó para inmunoglobulinas de clase G y M. Se realizó registro iconográfico de las observaciones.

Los variables clínicas se expresaron como presentes o ausentes, y el tiempo de evolución en meses. Se obtuvieron las medidas de resumen en cuanto a la edad y sexo.

### Resultados

En el periodo estudiado, de un total de 8,322 consultas de primera vez, se presentaron seis nuevos casos de enfermedades ampollasas autoinmunes en la consulta externa de Dermatología de la Unidad de Especialidades Médicas, de mayo del 2003 a abril del 2004 (*Cuadro 6 y Figura 2*).

Cuatro casos correspondieron a pénfigo, un caso a penfigoide ampollar, y un caso a dermatitis herpetiforme.

Los subtipos del pénfigo fueron el vulgar, el seborreico y el foliáceo (*Figura 3*).

Las características clínicas principales en estos pacientes se resumen en el *cuadro 7*. Los elementos diagnósticos y el patrón de los inmunodepósitos en la inmunofluorescencia directa se resumen en el *cuadro 8* y en las *figuras 4 a 9*.

**Cuadro 6.** Casos de enfermedades ampollas en la Consulta Externa de Dermatología de la Unidad de Especialidades Médicas, de mayo del 2003 a abril del 2004.

|        | Sexo      | Edad    | Diagnóstico clínico     | Diagnóstico histológico |
|--------|-----------|---------|-------------------------|-------------------------|
| Caso 1 | Masculino | 52 años | Eritrodermia            | Pénfigo foliáceo        |
| Caso 2 | Femenino  | 48 años | Pénfigo seborreico      | Pénfigo seborreico      |
| Caso 3 | Femenino  | 56 años | Pénfigo vulgar          | Pénfigo vulgar          |
| Caso 4 | Femenino  | 47 años | Pénfigo vulgar          | Pénfigo vulgar          |
| Caso 5 | Femenino  | 69 años | Penfigoide ampollar     | Penfigoide ampollar     |
| Caso 6 | Masculino | 20 años | Dermatitis herpetiforme | Dermatitis herpetiforme |

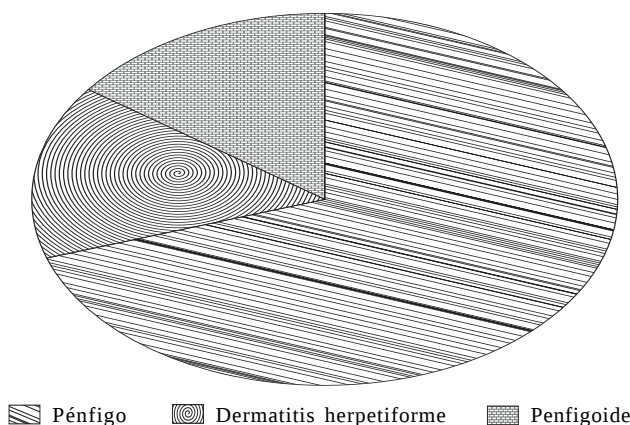


Figura 2. Enfermedades ampollas autoinmunes, diagnosticadas clínicamente y por inmunofluorescencia, de mayo del 2003 a abril del 2004.

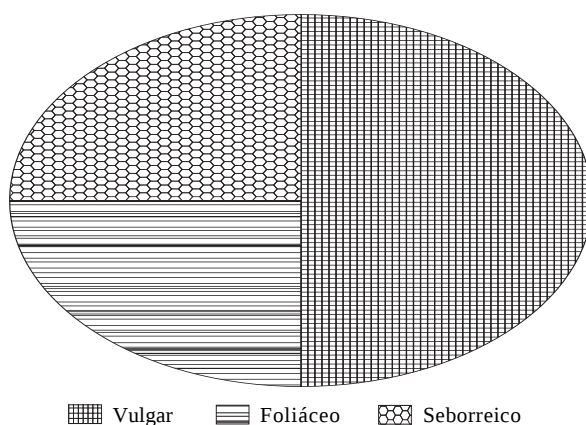


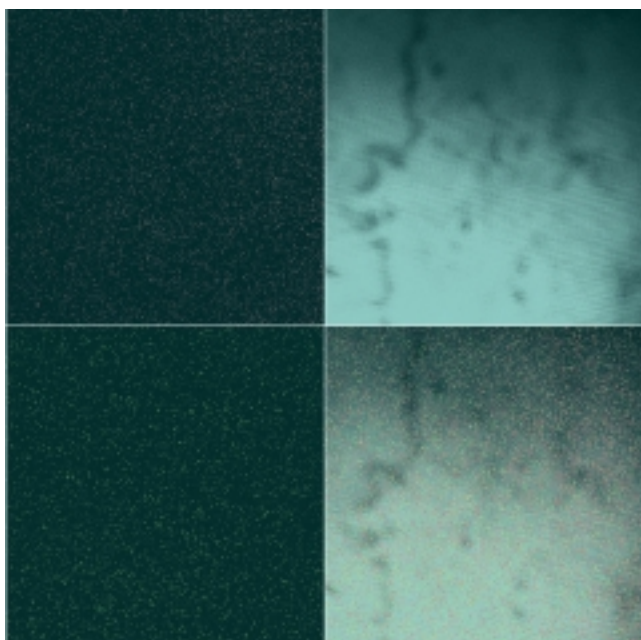
Figura 3. Diferenciación de los subtipos de pénfigo, de mayo del 2003 a abril del 2004.

**Cuadro 7.** Grado de afectación en los casos de enfermedades ampollas autoinmunes de la Consulta Externa de Dermatología de la Unidad de Especialidades Médicas, de mayo del 2003 a abril del 2004.

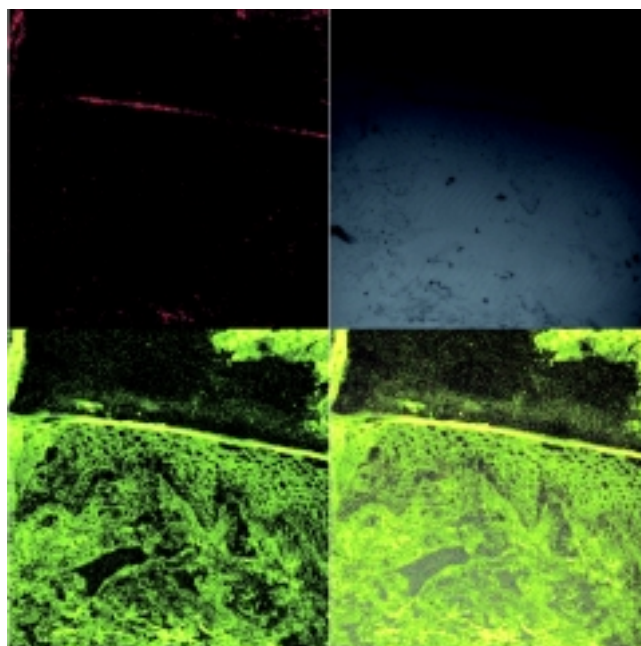
|        | Evolución | Segmentos afectados                           | Compromiso sistémico        |
|--------|-----------|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| Caso 1 | 6 meses   | Todos los segmentos                           | Sí (eritrodermia)           |
| Caso 2 | 5 meses   | Cabeza y tronco                               | No (sólo áreas seborreicas) |
| Caso 3 | 8 años    | Cabeza, tronco y extremidades                 | Sí                          |
| Caso 4 | 5 años    | Cabeza (cavidad oral)                         | No                          |
| Caso 5 | 6 años    | Extremidades superiores e inferiores          | No                          |
| Caso 6 | 1 año     | Tronco y extremidades superiores e inferiores | No                          |

**Cuadro 8.** Elementos diagnósticos de pacientes con enfermedades ampollas autoinmunes en la Consulta Externa de Dermatología de la Unidad de Especialidades Médicas, de mayo del 2003 a abril del 2004.

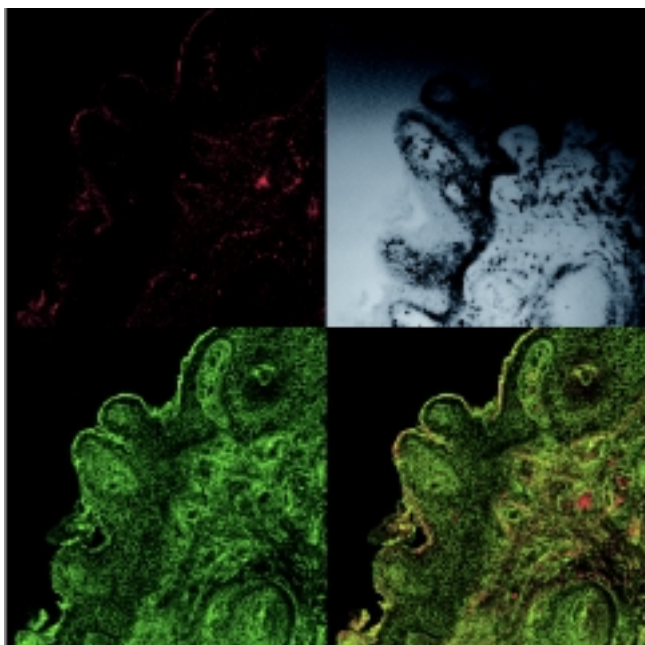
|        | Clínica                                                   | Histología                                                | Inmunofluorescencia                                                                     |
|--------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Caso 1 | Eritrodermia, Nikolsky (+)                                | Acantólisis a nivel del estrato granuloso                 | Depósitos en los espacios intercelulares de IgG e IgM, predominio en estrato granuloso. |
| Caso 2 | Placas eritematoescamosas áreas seborreicas, Nikolsky (+) | Acantólisis a nivel del estrato granuloso                 | Depósitos en los espacios intercelulares de IgG e IgM en el estrato granuloso           |
| Caso 3 | Ampollas, úlceras y costras; Nikolsky (+)                 | Ampolla suprabasal con acantólisis                        | Depósitos en los espacios intercelulares de IgG                                         |
| Caso 4 | Ulceraciones en cavidad oral y labios                     | Acantólisis suprabasal                                    | Depósitos en los espacios intercelulares de IgG                                         |
| Caso 5 | Ampollas tensas en brazos y piernas                       | Ampolla subepidérmica eosinófilos                         | Depósitos a lo largo de la membrana basal de IgM                                        |
| Caso 6 | Vesículas, costras, papulas y manchas; prurito intenso    | Ampolla subepidérmica en las papilas dérmicas neutrófilos | No se realizó inmunofluorescencia porque la pieza se autolisó                           |



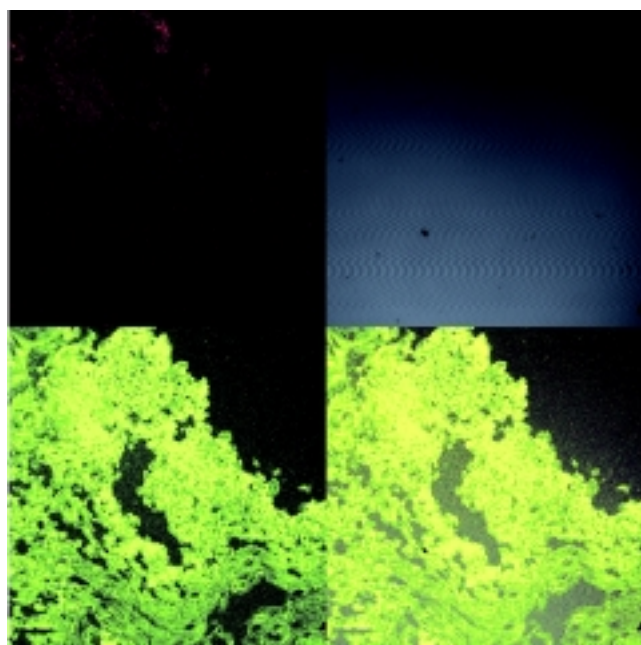
**Figura 4.** Control negativo. Esta pieza fue procesada en ausencia de inmunomarcadores. En el recuadro de arriba a la derecha se observa sólo la silueta formada por el contraste de interferencias. Ambos recuadros del lado izquierdo sin evidencia de fluorescencia. En el recuadro de abajo a la derecha no se observa colocalización.



**Figura 6.** Pénfigo seborreico 20X. Imagen que muestra la presencia de inmunodepósitos de IgM (rojo) y de IgG (verde) en la epidermis a nivel del estrato más superficial de este corte. Se puede observar la colocalización de ambas clases de inmunoglobulinas (IgG e IgM) en color amarillo, también en el estrato granuloso.



**Figura 5.** Pénfigo foliáceo 20X. Imagen que muestra la presencia de inmunodepósitos de IgM, IgG y colocalización de éstos en la epidermis, algunos puntos de la membrana basal y los vasos sanguíneos de la dermis; predomina el depósito a nivel del estrato más superficial.

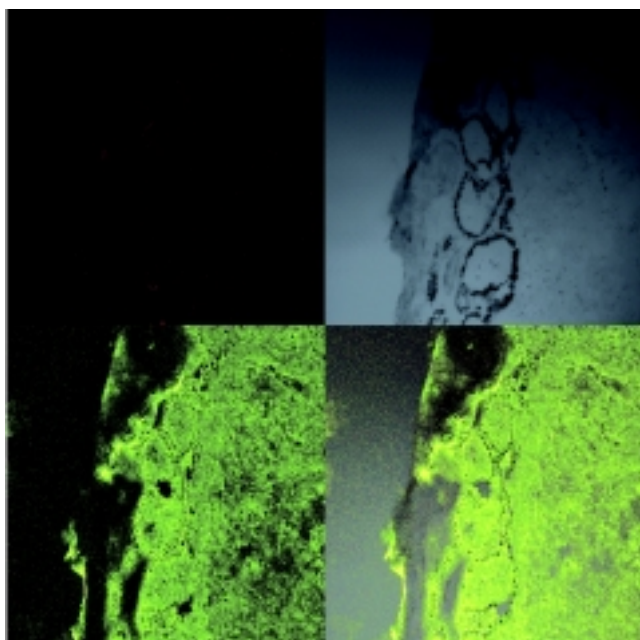


**Figura 7.** Pénfigo vulgar 20X. Lesión de cavidad oral. Imagen que muestra la presencia de inmunodepósitos, muy acentuados de IgG (verde) en la epidermis a lo largo de todos los estratos de forma intercelular. Los depósitos de IgM (rojo) no son perceptibles visualmente. No existe colocalización de ambas clases de inmunoglobulinas (IgG e IgM).

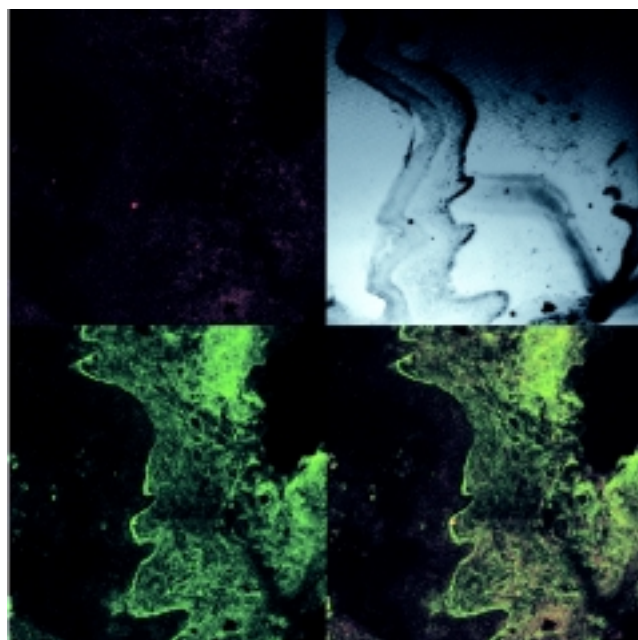
## Discusión

Las enfermedades ampollas autoinmunes son raras. Se calcula su incidencia alrededor de 0.5 a 3.2 casos por 100,000

habitantes. En nuestra población, seis nuevos casos fueron diagnosticados en el periodo de un año en la consulta de primera vez. Cuatro casos correspondieron al diagnóstico de pénfigo, dos de estos con pénfigo vulgar y dos con foliáceo



**Figura 8.** Pénfigo vulgar 20X. Piel perilesional (el corte es oblicuo) Imagen que muestra la presencia de inmunodepositos de IgG. Los depósitos de IgM (rojo) no son perceptibles visualmente. La presencia de depósitos de IgG (verde) en la epidermis localizada entre los procesos interpupilares, cortados oblicuamente en un patrón de “panal de abeja”. No existe colocalización de ambas clases de inmunoglobulinas (IgG e IgM).



**Figura 9.** Penfigoide ampollar 20X. Imagen que muestra la presencia de inmunodepositos. Los depósitos de IgM (rojo) son escasos sin un patrón característico; la presencia de depósitos de IgG (verde) en la membrana basal de la epidermis y algunos vasos sanguíneos de la dermis, con predominio marcado en la membrana basal de forma continua, a mayor aumento el depósito es de forma discontinua.

(uno con pénfigo foliáceo y otro con seborreico), una paciente con diagnóstico de penfigoide ampollar y uno con dermatitis herpetiforme.

La edad promedio para los pacientes con pénfigo fue de 50.75 años, predominó el sexo femenino en relación con el masculino de 3:1. En el penfigoide ampollar el paciente fue del sexo femenino, adulto mayor; en la dermatitis herpetiforme se trató de un adulto joven de 20 años.

A todos los pacientes se les realizó diagnóstico clínico e histológico. Dos de ellos tuvieron compromiso sistémico y ameritaron hospitalización, el resto con compromiso de moderado a leve, con manejo ambulatorio.

La inmunofluorescencia fue realizada y observada en microscopia confocal. Se detectaron los depósitos de inmunoglobulinas de clase M y G, y se realizó la colocalización de ambas en los casos posibles. En el control negativo, pieza que fue procesada en ausencia de inmunomarcadores, se observó sólo la silueta formada por el contraste de interferencias, sin evidencia de fluorescencia y la colocalización ausente.

En el pénfigo foliáceo, la inmunofluorescencia mostró la presencia de inmunodepositos de IgM y de IgG. Los depósitos de IgM en la epidermis, a nivel de la membrana basal y los vasos sanguíneos de la dermis, predominan a nivel del estrato más superficial, y los depósitos de IgG en la epidermis y algunos vasos sanguíneos de la dermis, con predominio en el estrato más superficial de la epidermis.

Se observó colocalización de depósitos de ambas clases de inmunoglobulinas (IgG e IgM) en los vasos sanguíneos de la dermis y de forma más importante en el estrato más superior de la epidermis. Al detalle del estrato más superior, los depósitos de IgM e IgG en la epidermis se observan entre los queratinocitos, dando una imagen de “panal de abeja”; predomina a nivel del estrato granuloso el depósito, en donde se observa de forma intensa. La colocalización de ambas clases de inmunoglobulinas se intensifica en este mismo estrato. En otros campos de la misma pieza están presentes los mismos hallazgos, a excepción de los depósitos de IgM en algunos segmentos de la membrana basal.

La afección a vasos sanguíneos por ambas inmunoglobulinas puede estar en relación con la gravedad del caso, recordando que este paciente presentó eritrodermia al momento de tomar la biopsia.

En el pénfigo seborreico se observó la presencia de inmunodepositos de IgM y de IgG, pero no a nivel de la membrana basal. Los depósitos de IgM en la epidermis sólo se observan a nivel del estrato más superficial, y los depósitos de IgG en la epidermis y algunos vasos sanguíneos de la dermis, con predominio en el estrato más superficial de la epidermis.

La colocalización de ambas clases de inmunoglobulinas es notoriamente a nivel del estrato granuloso.

Un mayor aumento permite ver en detalle que el estrato granuloso es donde se observa el mayor depósito de IgG e

IgM, excepto en espacios ovalados intercalados en más de un nivel en todo el grosor del depósito. La colocalización de ambas clases de inmunoglobulinas se intensifica en este mismo sitio y en el mismo patrón de depósito, a diferencia de lo reportado en la literatura, en donde se menciona que en el pénfigo eritematoso o seborreico pueden existir depósitos a nivel de la membrana basal, pero no fueron evidenciados con estos inmunoreactantes.

En el pénfigo vulgar se observó el depósito de IgG, con un patrón característico intercelular a lo largo de todo el grosor de la epidermis, como uno referido previamente con "panal de abeja". Es entre los queratinocitos donde se encuentran las estructuras antigénicas, blanco de los depósitos de inmunoglobulinas.

Los depósitos de IgM fueron mínimos sin un patrón identificable de depósito, y de igual manera la colocalización fue mínima. Las observaciones de lesiones de la cavidad oral representaron los depósitos más intensos de IgG, con mediciones más altas. En un corte realizado de forma oblicua se detectó queratinocitos situados entre los procesos interpilares con este mismo tipo de depósitos inmunes. En la imagen de penfigoide ampollar detectamos la presencia de IgM y de IgG, siendo los primeros poco notorios y sin un patrón bien establecido, en tanto los segundos se depositaron claramente a lo largo de toda la membrana basal de forma lineal.

El detalle de la membrana basal reveló que ese patrón continuo se transformaba en uno discontinuo, lo cual representa claramente el depósito a nivel de los hemidesmosomas, que no son estructuras siempre presentes a lo largo de toda la membrana basal.

La reconstrucción tridimensional, así como la proyección por secciones a través de la pieza, fueron realizadas en la unidad confocal. Por el momento, no están disponibles para ser mostradas en documento.

## REFERENCIAS

1. Diaz LA, Giudice GJ. End of the century overview of skin blisters. *Arch Dermatol* 2000; 136: 106-12.
2. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999; 103: 461-8.
3. Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 9: 651-8.
4. Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, et al. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pa-

thogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol* 1985; 85: 538-41.

5. Eyre RW, Stanley JR. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 1988; 81: 807-12.

6. Stanley JR. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. *J Clin Invest* 1989; 83: 1443-8.

7. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP 180. *J Clin Invest* 1993; 92: 2480-8.

8. Chorzelski TP, Jablonska S. IgA linear dermatosis of childhood (chronic bullous disease of childhood). *Br J Dermatol* 1979; 101: 535-42.

9. Beutner EH, Chorzelski TP, Wilson RM, Kumar V, Michel B, Helm F, et al. IgA pemphigus foliaceus: report of two cases and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 89-97.

10. Anhalt GJ, Kim S, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, et al. Paraneoplastic pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323: 1729-35.

11. Gammon WR, Briggaman RA, Wheeler CE Jr. Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 382-7.

12. Bean SF. Cicatrizing pemphigoid. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V (Ed.). *Immunopathology of the skin*. 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons; 1987, p. 355-60.

13. Barton DD, Fine JD, Gammon WR, Sams WM Jr. Bullous systemic lupus erythematosus: an unusual clinical course and detectable circulating autoantibodies to the epidermolysis bullosa acquisita antigen. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 369-73.

14. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA, Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V (Ed.). *Immunopathology of the skin*. 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons; 1987, p. 3-40.

15. Katz SI, Halprin KM, Inderbitzin TM. The use of human skin for the detection of anti-epithelial autoantibodies: a diagnostic and prognostic test. *J Invest Dermatol* 1969; 53: 390-9.

16. Woodley DT, Sauder D, Talley MJ, Silver M, Grotendorst G, Quarstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 149-53.

17. Jordon RE, Triftshauser CT, Schroeter AL. Direct immunofluorescent studies of pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1971; 103: 486-91.

18. Goldberg DJ, Sabolinski M, Bystry J-C. Bullous pemphigoid antibodies: human skin as a substrate for indirect immunofluorescence assay. *Arch Dermatol* 1985; 121: 1137-40.

19. Mutasim DY, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 803-22.

20. Murray JM. Neuropathology in depth - The role of confocal microscopy. *J Neuropathol Experim Neurol* 1992; 51: 475-87.

21. Wallen P. Confocal microscopy in chemical neuroanatomy. *J Chem Neuroanatomy* 1991; 4: 387-95.

22. Wright SJ, Schatten G. Confocal fluorescence microscopy and three dimensional reconstruction. *J Electron Microscopy Technique* 1991; 18: 2-10.

## Abreviaturas.

EAA: Epidermolísis ampollosa adquirida  
EIC: Espacio intercelular  
ELA: Enfermedad por IgA lineal  
DH: Dermatitis herpetiforme  
IFD: Inmunofluorescencia directa  
IFI: Inmunofluorescencia indirecta  
IgA: Inmunoglobulina de clase A  
IgM: Inmunoglobulina de clase M  
IgG: Inmunoglobulina de clase G  
LES: Lupus eritematoso sistémico

MB: Membrana basal  
PA: Penfigoide ampollar  
PC: Penfigoide cicatricial  
PG: Penfigoide gestacional  
PCT: Porfiria cutánea tarda  
PE: Pénfigo eritematoso  
PF: Pénfigo foliáceo  
PPN: Pénfigo paraneoplásico  
PV: Pénfigo vulgar  
SSS: Piel separada con solución salina 1%