

ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at
www.elsevier.es/ad



NOVEDADES EN DERMATOLOGÍA

Mapeo por inmunofluorescencia para el diagnóstico de epidermólisis ampullosa congénita

R. Cepeda-Valdés^a, G. Pohla-Gubo^b, J.R. Borbolla-Escoboza^a, O. Barboza-Quintana^c, J. Ancer-Rodríguez^c, H. Hintner^b y J.C. Salas-Alanis^{a,d,*}

^aCentro de Investigación Clínica, Escuela de Biotecnología y Salud, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, México

^bDepartamento de Dermatología, Universidad Médica Privada de Paracelusus, Salzburg, Austria

^cServicio de Patología, Hospital Universitario «Dr. José E. González», Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México

^dDepartamento de Dermatología, Hospital Universitario «Dr. José E. González», Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México

Recibido el 11 de marzo de 2010; aceptado el 10 de junio de 2010

Disponible en Internet el 10 de agosto de 2010

PALABRAS CLAVE

Epidermólisis ampullosa;
Clasificación;
Mapeo antigénico;
Inmunofluorescencia

Resumen

Las herramientas para el diagnóstico en las epidermólisis ampullosas (EA) han tenido un gran avance desde que Hintner et al, introdujeron el mapeo antigénico como prueba diagnóstica en este grupo de genodermatosis. La utilización de anticuerpos monoclonales/policlonales dirigidos contra algunas de las proteínas específicas que conforman la epidermis y la membrana basal epidérmica, han servido para clasificar los 4 tipos de epidermólisis ampullosa y subclasificar todas sus variantes. Ante la presencia de un recién nacido con ampollas surgen diagnósticos diferenciales múltiples, en donde la microscopia de luz orienta el diagnóstico de epidermólisis ampullosa. Sin embargo, el mapeo por inmunofluorescencia y la microscopia electrónica permiten confirmar y clasificar a las epidermólisis ampullosas congénitas.

En este artículo, se explica la importancia y metodología para desarrollar la técnica de mapeo antigénico por inmunofluorescencia, con el propósito de clasificar y subclasificar las epidermólisis ampullosas.

© 2010 Elsevier España, S.L. y AEDV. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: drjuliosalas@gmail.com (J.C. Salas-Alanis).

KEYWORDS

Epidermolysis bullosa;
Classification;
Antigen mapping;
Immunofluorescence

Immunofluorescence Mapping for Diagnosis of Congenital Epidermolysis Bullosa**Abstract**

The tools for diagnosis of epidermolysis bullosa have advanced greatly since Hintner's group introduced antigen mapping as a diagnostic test for this family of genodermatoses. Monoclonal or polyclonal antibodies raised against some of the specific proteins found in the epidermis and basement membrane of the epidermis have allowed 4 types of epidermolysis bullosa to be identified and all variants to be classified. When a newborn baby presents with blisters, many conditions are implicated in the differential diagnosis. Examination under an optical microscope can suggest epidermolysis bullosa, but immunofluorescence mapping and electron microscopy are required for confirmation of the diagnosis and further classification of congenital epidermolysis bullosa. This article explains the importance of immunofluorescence antigen mapping and describes the methods employed for classification and subclassification of epidermolysis bullosa.

© 2010 Elsevier España, S.L. and AEDV. All rights reserved.

Introducción

El término epidermolisis ampollosa (EA) (EB, por sus siglas en inglés *Epidermolysis Bullosa*) empleado por primera vez por Koebner en 1886 describe un grupo de enfermedades genéticas, clínicamente heterogéneas, caracterizadas por la aparición de ampollas, erosiones y úlceras en piel y/o mucosas, secundarias al mínimo traumatismo y/o de aparición espontánea, razón por la que también se les denomina enfermedades mecano-ampollosas¹.

De acuerdo al fenotipo, modo de herencia y genotipo, actualmente han sido descritos más de 30 subtipos de EA. No obstante, la enfermedad se divide en tres tipos principales de acuerdo al nivel en que se encuentran las ampollas^{2,3}, determinados por inmunofluorescencia y/o microscopía electrónica (ME): epidermolisis ampollosa simple (EAS), de unión (EAU) y distrófica (EAD). En las formas simples (EBS, *epidermolysis bullosa simplex*) las ampollas se encuentran en la epidermis (epidermolíticas), en la EA de unión (JEB, *junctional epidermolysis bullosa*) es posible observar la separación de la lamina lucida de la unión dermo-epidérmica y en las formas distróficas de EA (DEB, *dystrophic epidermolysis bullosa*) las ampollas afectan la dermis papilar (dermolíticas)^{4,5}. De acuerdo a la nueva clasificación publicada en 2008, por el consenso internacional

para el diagnóstico de EA, ha sido añadido un cuarto tipo mixto (síndrome de Kindler), basado en los diferentes niveles en los que se presentan las ampollas en la piel afectada⁶ (fig. 1).

El desafío en el diagnóstico de los tipos de EA es particularmente difícil, si solo se cuenta con la presentación clínica del paciente y aun más laborioso en ausencia de historia familiar del paciente⁷. El recién nacido es propenso a desarrollar ampollas y erosiones en respuesta a agentes externos como calor, irritantes químicos y traumatismos^{8,9} (fig. 2). A este hecho se añade que durante el periodo neonatal se presentan la mayoría de las enfermedades caracterizadas por fragilidad en la piel, circunstancia que nos plantea un amplio espectro de diagnósticos diferenciales de EA congénita, desde enfermedades transitorias benignas, hasta procesos mutilantes que comprometen la vida del paciente. El diagnóstico diferencial debe comprender las siguientes enfermedades: ampollas por succión, eritrodermia ictiosiforme congénita ampollosa, impétigo ampolloso, síndrome de piel escaldada por estafilococo, herpes simple neonatal, varicela zoster intrauterina, incontinencia pigmentaria (síndrome de Bloch-Sulzberger), aplasia cutis, hipoplasia focal dérmica (síndrome de Goltz), porfiria eritropoyética congénita (enfermedad de Gunther), lupus eritematoso neonatal, ectima gangrenoso,

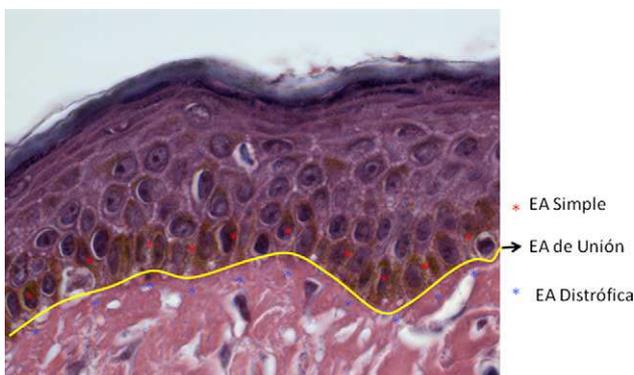


Figura 1 Membrana basal epidérmica y ubicación de los tipos principales de epidermolisis ampollosa H y E (100 ×).



Figura 2 Recién nacido con ampollas diseminadas en la cara, tórax y manos.

infección por *Aspergillus* y enfermedades ampollas autoinmunes como, pénfigo o penfigoide gestationis⁸⁻¹¹.

Por otro lado, en infantes y adultos, la epidermólisis ampollosa congénita presenta características clínicas que recuerdan a la mastocitosis ampollosa, nécrosis epidérmica tóxica o algunas enfermedades autoinmunes como penfigoide ampollosa, penfigoide cicatrizal, enfermedad IgA lineal, o EA adquirida⁹⁻¹¹.

Una vez excluidas estas patologías mediante una anamnesis detallada, junto a la exploración física completa, y la realización de cultivos de las lesiones con tinciones de Gram y Giemsa para infecciones bacterianas y frotis de Tzanck en los casos de sospecha de infección viral o KOH en micosis, el diagnóstico de EA deberá sospecharse. En estos casos, realizaremos una biopsia de piel, teñida con hematoxilina y eosina así como mapeo antigénico por inmunofluorescencia y/o para microscopía electrónica. Mediante estas dos últimas técnicas se pretende determinar el plano de clivaje o sitio de formación de las ampollas en la epidermis o membrana basal epidérmica⁹⁻¹³.

La microscopia de luz tiene poco valor diagnóstico para la enfermedad, debido a que en la mayoría de los casos únicamente se observa una ampolla subepidérmica pobre en células inflamatorias, indistintamente del tipo de EA. Sin embargo en algunos casos de EAS es posible visualizar ampollas intraepidérmicas en el estrato basal, secundarias a la citólisis de los queratinocitos basales¹⁴ (fig. 3).

Para llevar a cabo el diagnóstico y la clasificación precisa de la enfermedad, la primera herramienta de laboratorio utilizada con éxito fue la ME y durante muchos años ha sido la técnica diagnóstica más empleada, ya que permite visualizar detalladamente la estructura de las células, organelas, citoplasma y especialmente los tonofilamentos de citoqueratinas, hemidesmosomas y fibrillas de anclaje, involucrados en esta patología¹⁵. Además, permite observar el sitio de separación o formación de la ampolla en los queratinocitos basales y/o membrana basal. Sin embargo, la ME es una herramienta costosa, consume tiempo y principalmente es necesario contar con un especialista en la técnica con experiencia en la enfermedad.

Por esta razón la interpretación de los resultados de la ME, pueden ser en ocasiones imprecisos y solo existen pocos laboratorios con apropiada experiencia y habilidades para el análisis e interpretación de las muestras de los pacientes con EA congénita^{5,7}. En 1981 Hintner et al, describieron por primera vez el método de mapeo antigénico por inmunofluorescencia para la enfermedad, el cual se basa en la detección de proteínas estructurales de la epidermis y/o la unión dermo-epidérmica usando anticuerpos policlonales y/o monoclonales⁵. Con este método se busca determinar el

sitio de clivaje y la localización de la ampolla, al exhibir un antígeno determinado (como por ejemplo, colágeno tipo IV) en una ampolla «natural» o inducida. Esta técnica, dependiendo de los anticuerpos utilizados, permite comprobar la expresión normal, reducción o ausencia de las proteínas estructurales. Actualmente existen varios anticuerpos que reconocen las proteínas estructurales de los queratinocitos y/o de la unión dermo-epidérmica en la membrana basal, los cuales se conoce que están involucrados en la patogénesis de la enfermedad.

Afortunadamente algunos de estos anticuerpos están disponibles comercialmente en todo el mundo para el desarrollo del método de inmunofluorescencia cutánea^{6,16,17}. El mapeo por inmunofluorescencia ha desplazado a la ME y actualmente es el primer examen de laboratorio empleado para hacer el diagnóstico de EA y distinguir los diferentes tipos de la enfermedad. Además es la base para distinguir las proteínas blanco del análisis de mutaciones^{6,15}.

Biopsia

El sitio adecuado para tomar la biopsia de piel en un paciente con sospecha de EA congénita es preferentemente la zona perilesional sana de una ampolla reciente (fig. 4). En los casos en que no se encuentre una ampolla reciente debe friccionarse la piel sana con un borrador durante 2 min con el fin de producir una ampolla nueva. El propósito de tomar una biopsia reciente o inducida es evitar los cambios en las proteínas estructurales secundarios a la propia herida y al proceso inherente de cicatrización^{5-7,18}.



Figura 4 Sitio ideal para realizar una biopsia para inmunofluorescencia.



Figura 3 a) Ampolla sub epidérmica carente de células inflamatorias característica de cualquier forma de epidermólisis ampollosa H y E 20 × . b) Ampolla basal característica de la EA simple H y E 20 × . c) Dos queratinocitos remanentes adheridos a la membrana basal en EA simple (*) H y E 60 × .

Fijación y almacenamiento de la muestra

La muestra de piel debe ser inmediatamente colocada en solución de Michel descrita originalmente por Michel et al en 1973 y modificada por Vaughan et al en 1995 (2,5 ml de amortiguador de citratos a un pH de 7,4, con una concentración de 1 M, 5 ml de sulfato de magnesio a una concentración de 0,1 M, 5 ml de N-etilmaleimida a una concentración de 0,1 M, 55 g de sulfato de amonio, diluido en 87,5 ml de agua, para un volumen total de 100 ml ajustado a un pH de 7,4 con un 1 M de hidróxido de sodio)¹⁸⁻²⁰. En este medio las muestras pueden ser almacenadas durante 28 días a temperatura ambiente para ser enviadas a un laboratorio especializado en cualquier parte del mundo para realizar el mapeo antigénico. De forma previa a cortar la muestra, esta debe ser lavada en una solución salina amortiguada por fosfatos por varias horas para mejorar la sensibilidad diagnóstica. Después, las muestras pueden ser cortadas en criostato para posteriormente teñirlas²¹⁻²³.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios para realizar la técnica de mapeo por inmunofluorescencia cutánea tienen diferentes orígenes animales (rata, ratón, conejo), los cuales se fijan a las proteínas estructurales específicas en la piel que deseamos estudiar. Los anticuerpos que podemos utilizar para el mapeo antigénico están dirigidos contra citoqueratina 5, citoqueratina 14, plectina, integrina $\alpha 6$ y $\beta 4$, colágeno tipo XVII (180 kD PBAG2), laminina 332 (anteriormente conocida como laminina 5) con sus tres cadenas $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ y finalmente colágeno tipo VII^{24,25}. Para una mejor visualización del nivel de la ampolla, especialmente en pacientes con EA distrófica, se utilizan adicionalmente anticuerpos contra colágeno tipo IV (presente en la lamina densa de la unión dermo-epidérmica) (tabla 1).

Todos los primeros anticuerpos son de clase IgG y la mayoría de ellos son monoclonales y están desarrollados en ratón. Por lo tanto, el segundo anticuerpo debe estar

dirigido hacia el anticuerpo IgG, normalmente conjugado con una partícula de fluorescencia isotiocianato (FITC). Una excepción es el anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$, el cual se desarrolla en rata, por lo que el segundo anticuerpo es de tipo IgG anti-rata. La partícula FITC se conjuga con el segundo anticuerpo y produce una señal específica de fluorescencia en un rango de 450–490 nm, lo que permite la visualización del anticuerpo específico unido a la proteína en estudio que se desea visualizar en el microscopio de fluorescencia.

Dependiendo de la frecuencia de utilización de la inmunofluorescencia y la dilución final necesaria para la técnica, los anticuerpos deben ser almacenados en cantidades que permitan la preparación en fresco del total de las muestras en cada sesión, con la finalidad de mantener los anticuerpos en congelación hasta la fecha de caducidad y evitar contaminación²².

Técnica de tinción

Durante la técnica de tinción para el mapeo por inmunofluorescencia se recomienda utilizar de 3 a 4 cortes de cada muestra, cada uno de 4–6 μ de grosor, así como 1–2 cortes de piel, provenientes de pacientes sanos que se utilizaran como controles positivos (fig. 5). Esto permite obtener un punto de referencia de la inmunofluorescencia de las proteínas estructurales en estudio, para posteriormente comparar la inmunoreactividad de las proteínas del control sano con la inmunoreactividad de las proteínas de los pacientes con EA.

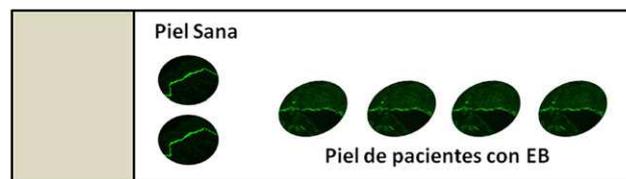


Figura 5 Preparación de una laminilla para la técnica de tinción por inmunofluorescencia.

Tabla 1 Lista de anticuerpos y diluciones utilizadas actualmente en inmunofluorescencia para el diagnóstico de epidermolísis bullosa

	Proveedor	Dilución	Hospedero	EB Subtipo
1.º Anticuerpo				
Citoqueratina 5	Millipore [®]	1:50	Ratón	EAS
Citoqueratina 14	Millipore [®]	1:100	Ratón	EAS
Colágeno XVII	Marinkovich	1:20	Ratón	EAU
Plectina	Wiche	1:2	Ratón	EAS, EAU
Integrina α -6	Millipore [®]	1:50	Rata	EAS, EAU
Integrina β -4	Millipore [®]	1:50	Ratón	EAS, EAU
Laminina 332 ^a	Millipore [®]	1:50	Ratón	EAU
Colágeno IV	Millipore [®]	1:50	Ratón	–
Colágeno VII	Millipore [®]	1:50	Ratón	EAD
2.º anticuerpo				
IgG	Millipore [®]	1:100–400	Anti-rata	
IgG	Dako [®]	1:100	Anti-ratón	

^aAnteriormente laminina 5.

De acuerdo al número de anticuerpos a determinar se preparan igual número de laminillas para la tinción de las posibles proteínas involucradas. Dos de estas laminillas sirven como controles negativos, con la finalidad de evaluar y excluir la inmunoreactividad no específica causada por el segundo anticuerpo. Las laminillas se incuban en solución salina amortiguada por fosfatos (SSAF) con el primer anticuerpo correspondiente, para ser incubadas con el segundo anticuerpo con las partículas de FITC contra ratón conjugado o contra rata. Cada laminilla es incubada con la dilución apropiada para el primer anticuerpo (SSAF en el caso del control negativo) durante 30 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después, las muestras se lavan en SSAF en dos ocasiones por 15 min, y con la dilución apropiada del segundo anticuerpo se incuban por 30 min en las mismas condiciones.

Posteriormente, las muestras deben lavarse nuevamente dos veces en SSAF por 15 min, para inmediatamente cubrir con glicerol y cubreobjetos. Finalmente en el microscopio de fluorescencia, se observa y se toma fotografías del patrón y reactividad de la fluorescencia, para ser archivadas en el expediente de cada paciente. Esta técnica logra ser estable por varias semanas cuando se mantienen en refrigeración a 4 °C.

Patrones de tinción

En el mapeo antigénico por inmunofluorescencia es posible visualizar la localización y expresión de las proteínas estructurales involucradas en la patogénesis de las diferentes formas de la enfermedad, así como el posible sitio de separación y/o formación de la ampolla. Sin embargo, la intensidad de la tinción de las proteínas es influenciada por

varios factores como son la parte del cuerpo de la que se obtuvo la piel (normal o piel afectada), la exposición solar previa, así como y la edad de los pacientes. Para realizar una adecuada correlación entre piel afectada y el control sano, es indispensable tomar cortes de piel de pacientes de la misma edad y partes del cuerpo que los controles. Además el tiempo de almacenaje en la solución de Michel (preferentemente no más de 28 días), las condiciones de transporte (altas temperaturas, congelación-descongelación) o las condiciones de almacenaje de los anticuerpos pueden influenciar los resultados de la técnica de inmunofluorescencia. Para evaluar los resultados de la tinción es útil hacer una escala del 1–4 de acuerdo a la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo, donde (+) es intensidad dudosa, (++) intensidad débil, (+++) moderada intensidad, (++++) muy brillante. Como se mencionó con anterioridad, es de gran importancia tener una ampolla en la biopsia, ya que esto podrá permitir visualizar el nivel en la piel en la que aparece la separación.

En el caso de EAS, al utilizar por ejemplo el anticuerpo para el colágeno IV (presente en la lamina densa de la unión demo-epidérmica) se encuentran ampollas intraepidérmicas, localizadas en el nivel de los queratinocitos basales: en estos casos observaremos que la fluorescencia, situada en la lámina densa, permanece en el suelo de la ampolla junto a restos de queratinocitos basales unidos a la membrana basal (fig. 6a).

Cuando estudiamos lesiones de EA de unión suelen utilizarse en el mapeo antigénico anticuerpos frente a colágeno IV y lamininas en las técnicas de inmunofluorescencia. En estos casos observaremos que la fluorescencia se encuentra en el piso de la ampolla (fig. 6b y c), aunque en el caso de las citoqueratinas el marcaje únicamente se encuentra en el techo de la ampolla (fig. 6b).

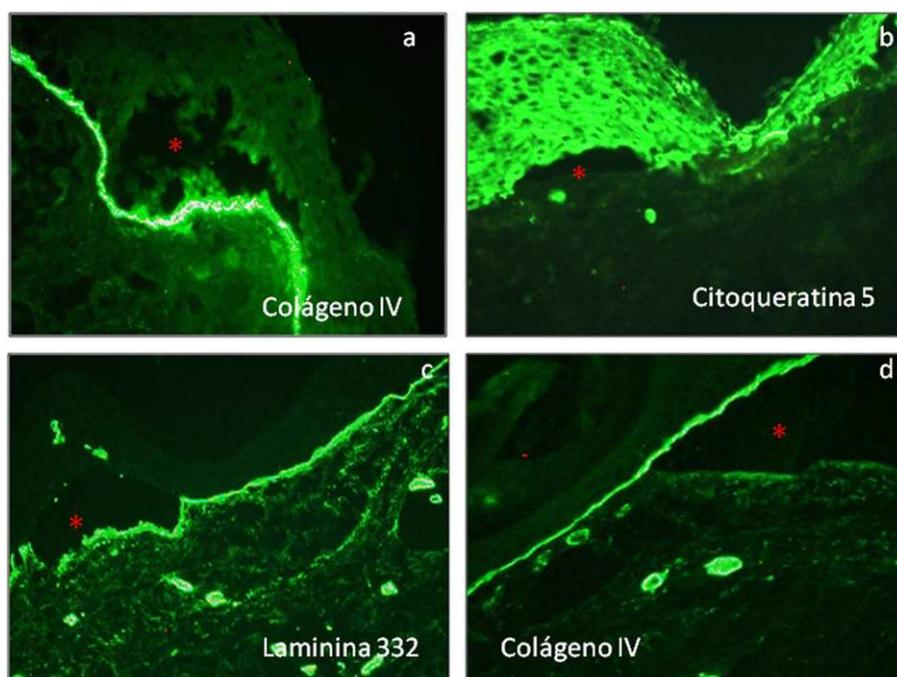


Figura 6 a) Ampolla epidérmica en zona de citoqueratina 5, 14, plectina y integrinas $\alpha 6\beta 4$ (20 \times), b y c) ampolla en la lamina lúcida (20 \times) (citoqueratina 5 y laminina 332), d) ampolla en dermis papilar debajo de lamina lúcida (20 \times) (colágeno VII). *Ampollas

Tabla 2 Alteraciones antigénicas en la epidermolísis ampollosa

Tipo	Subtipo mayor	Subtipo	Proteína afectada	Localización de la ampolla	Patrón de tinción	
Epidermolísis ampollosa simple (EAS)	Suprabasal	<i>Letal acantolítica</i>	Desmoplaquina	Suprabasal		
		<i>Deficiencia de placofilina</i>	Placofilina 1	Suprabasal		
	Basal	<i>EAS superficialis (EASS)</i>	¿?	¿?	Suprabasal	
		<i>EAS, localizada (EAS-loc)</i>	Citoqueratinas 5 y 14		Basal	Normal
		<i>EAS, Downling-Meara (EAS-DM)</i>	Citoqueratinas 5 y 14		Basal	Normal
		<i>EAS, otras generalizadas (EAS, gen-nonDM/EAS, gen-nDM)</i>	Citoqueratinas 5 y 14		Basal	Normal
		<i>EAS con distrofia muscular (EAS-MD)</i>	Plectina		Basal (encima de los hemidesmosomas)	Ausente o reducida
		<i>EAS con pigmentación moteada (EAS-MP)</i>	Citoqueratina 5		Basal	Normal
		<i>EAS con atresia pilórica (EAS-PA)</i>	Plectina		Basal (encima de los hemidesmosomas)	Ausente o reducida/
			Integrinas $\alpha 6\beta 4$		Lámina lúcida superior (transmembrana)	Ausente o reducida
			<i>EAS, autosómica recesiva (EAS-AR)</i>	Citoqueratina 14	Basal	Ausente o altamente reducido
			<i>EAS, Ogra (EAS-Og)</i>	Plectina	Basal (encima de los hemidesmosomas)	Reducida
			<i>EAS, cercenada migratoria (EAS-migr)</i>	Citoqueratina 5	Basal	Normal
Epidermolísis ampollosa de unión (EAU)	EAU, Herlitz (EAU-H)	–	Laminina-332	Lámina lúcida (filamentos de anclaje)	Ausente o altamente reducida	
	EAU, otras (EAU-O)	<i>EAU, no Herlitz, generalizada (EAU-nH gen)</i>	Laminina-332 mayormente	Lámina lúcida (filamentos de anclaje)	Reducida	
		<i>EAU, no Herlitz, localizada (EAU-nH loc)</i>	Colágeno tipo XVII	Debajo de hemidesmosomas	Ausente	
		<i>EAU con atresia pilórica (EAU-PA)</i>	Colágeno tipo XVII	Debajo de hemidesmosomas	Reducida	
		<i>EAU, inversa (EAU-I)</i>	Integrinas $\alpha 6\beta 4$	Lámina lúcida superior (transmembrana)	Reducida	
		<i>EAU, inicio tardío (EAU-lo)</i>	Laminina-332	Lámina lúcida (filamentos de anclaje)	Reducida	
		<i>Síndrome laringo-onico-cutáneo (LOC)</i>	¿?	¿?		
	<i>Síndrome laringo-onico-cutáneo (LOC)</i>	Laminina-332/cadena $\alpha 3$	Lámina lúcida (filamentos de anclaje)			
Epidermolísis ampollosa distrófica (EAD)	EAD dominante (EADd)	<i>EADd, generalizada (EADd-gen)</i>	Colágeno tipo VII	Fibras de anclaje de la sub-lamina densa	Normal	
		<i>EADd, acral (EADd-ac)</i>				
		<i>EADd, pretibial (EADd-Pt)</i>				
		<i>EADd, pruriginosa (EADd-Pr)</i>				
		<i>EADd, solo uñas (EADd-na)</i>				

EADd, dermolisis ampollosa del neonato (EADd-BDN)	Patrón granular con queratinocitos basales y supra-basales. Ausente o altamente reducida. (Solo en el período de ampollas activas)	Fibras de anclaje de la sub-lamina densa	Colágeno tipo VII	Ausente o altamente reducida
EAD recesiva (EADr)	EADr, severa generalizada (EADr-sev gen) EADr, otras generalizadas (EADr-O)			Variable
				Normal
	EADr, inversa (EADr-I) EADr, pretibial (EADr-Pt) EADr, pruriginosa (EADr-Pr) EADr, centripetalis (EADr-Ce) EADr, dermolisis ampollosa del neonato (EADr-BDN)			

Fuentes: Fine JD et al, Yásemides et al^{6,7}.

Finalmente, en los casos de EA distróficas los estudios de mapeo suelen realizarse con anticuerpos dirigidos frente a citoqueratinas, colágeno IV y lamininas. De esta manera, observaremos que la fluorescencia se localiza solo en el techo de la ampolla²⁶ (fig. 6d). En cada tipo y subtipo de la enfermedad se pueden distinguir diferentes proteínas alteradas de la piel. Por otro lado la expresión de estas proteínas, puede llegar a ser igual a los controles, reducida en intensidad o completamente ausente (tabla 2).

Epidermólisis ampollosa simple (EAS)

En pacientes con EAS (fig. 7a) las principales proteínas involucradas en la patología de la enfermedad son las citoqueratinas 5 y 14, plectina, integrina α6 e integrina β4. La alteración en alguna de estas proteínas promueve la formación de ampollas intraepidérmicas, por citólisis de los queratinocitos basales (fig. 7b–d). En general las proteínas son expresadas con una intensidad similar a los controles, excepto en la EAS autosómica recesiva²⁶, donde los pacientes tienen ausencia de citoqueratina 14.

En pacientes con EAS con ditrofia muscular (EAS-MD) la plectina esta generalmente ausente y en raros casos como en EAS Onga la plectina se encuentra marcadamente reducida. En los pacientes con atresia pilórica (EAS o EAU) la plectina, así como las integrinas α6β4 se encuentran reducidas o ausentes^{27,28}.

Epidermólisis ampollosa de unión (EAU)

Las proteínas blanco principales en EAU son el colágeno tipo XVII (PBG2) y la laminina 332. Estas proteínas pueden ser expresadas normalmente, reducidas o ausentes, al comparlas con el control sano. En los casos con ampollas en la unión dermoepidérmica, la inmuno-reactividad aparece en el techo o en el piso de las ampollas dependiendo del tipo de EAU^{29,30} (fig. 8).

En los casos del subtipo de EAU-Herlitz la laminina 332 se encuentra ausente en la mayoría de los casos o marcadamente reducida (fig. 8f). En los casos de EAU generalizado no-Herlitz (EAU-nH gen) (fig. 8a–d) las proteínas alteradas son la laminina 332 o el colágeno tipo XVII. En la mayoría de los casos con EAU-nH, la laminina 332 se encuentra reducida (fig. 8g), y en el resto de los pacientes el colágeno tipo XVII está ausente o reducida. Los pacientes que anteriormente se clasificaban como EAU generalizada atrófica benigna (anteriormente GABEB), la reactividad de la laminina 332 permanece similar a los controles.

Epidermólisis ampollosa distrófica (EAD)

Los subtipos EA distrófica son causados por mutaciones en el colágeno tipo VII. En los pacientes con el tipo severo generalizado de epidermólisis ampollosa (RDEB, *recessive dystrophic epidermolysis bullosa*), la inmunofluorescencia al colágeno tipo VII se encuentra ausente, en la mayoría de los casos (fig. 9a–d). En estos casos se utiliza el anticuerpo contra colágeno tipo IV para visualizar el nivel de la ampolla. Una reacción del anticuerpo contra el colágeno tipo IV, en el

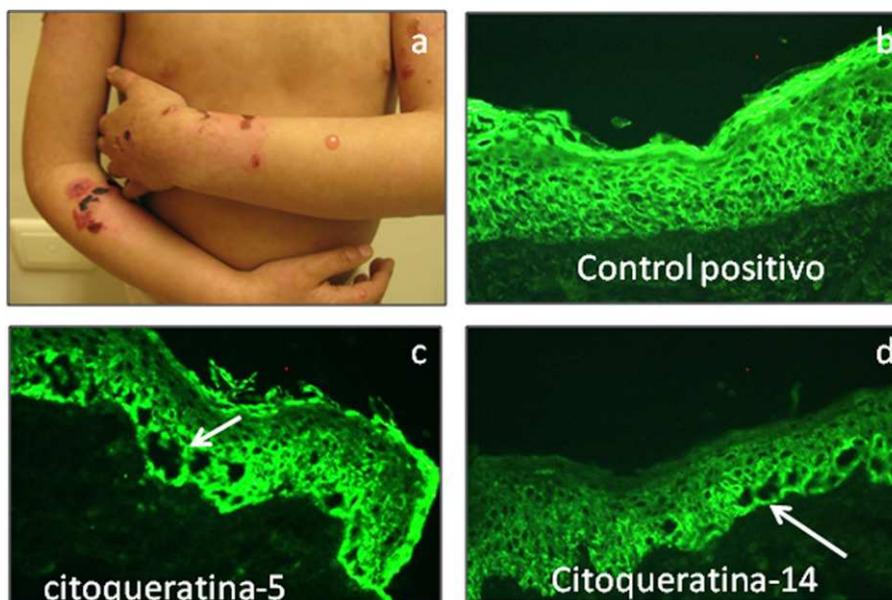


Figura 7 a) Manifestaciones clínicas de un paciente con EAS. b) Control positivo de piel sana teñido para citoqueratina 5 (20 ×) c y d) citoqueratina 5 y 14 las cuales muestran ampollas intraepidérmicas basales (20 ×).

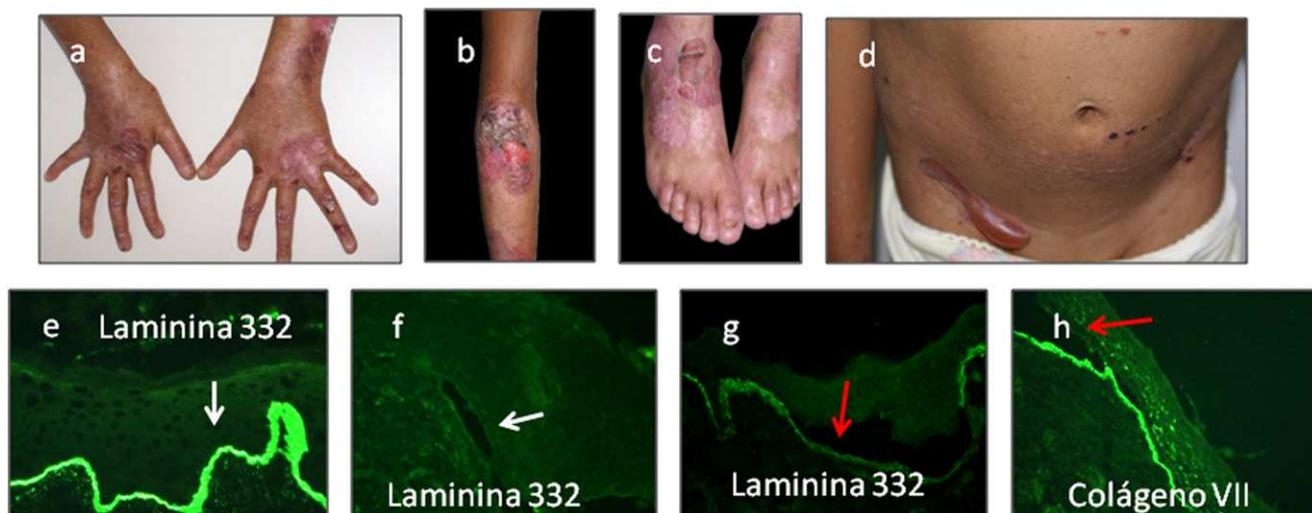


Figura 8 a–d) Pacientes con EAU-nH generalizada; ampollas hemorrágicas, onicodistrofia, ampollas tensas y costras hemorrágicas. e y f) laminina 332 control (20 ×). f) Laminina 332 ausente característico de EAU-Herlitz (20 ×). g) Laminina-5 reducida en intensidad (20 ×) y h) colágeno tipo VII (20 ×) de intensidad normal en el piso de la ampolla (flechas rojas) característico de EAU-nH gen.

techo de la separación, indica la presencia de una ampolla en dermis papilar y confirma el subtipo distrófico de EA. Por otro lado, cuando el colágeno IV aparece en el piso de la ampolla deberemos plantear como posibles diagnósticos los subtipos EAU o EAS (figs. 7 y 8).

La expresión del colágeno tipo VII puede estar disminuido o incluso ser normal en el subtipo de EA distrófica recesiva otros generalizados (EADr-O)⁶ (fig. 9e–h).

Conclusión

El mapeo antigénico por inmunofluorescencia es el procedimiento de elección para el diagnóstico preliminar y

clasificación posterior de los diferentes tipos de EA. Los patrones de inmunofluorescencia, (para determinar el nivel de la formación de ampollas y visualizar la expresión de proteínas específicas) identifican las proteínas involucradas en la fisiopatología de la enfermedad. Aunque la identificación de los genes alterados en cada paciente es el criterio definitivo para el diagnóstico de la enfermedad, el mapeo antigénico permite evaluar en un primer momento la expresión de las proteínas epidérmicas y localizar así la zona de la epidermis alterada. Posteriormente, deberemos realizar estudios moleculares que nos permitan realizar un diagnóstico definitivo al analizar las mutaciones en las proteínas estructuralmente alteradas.

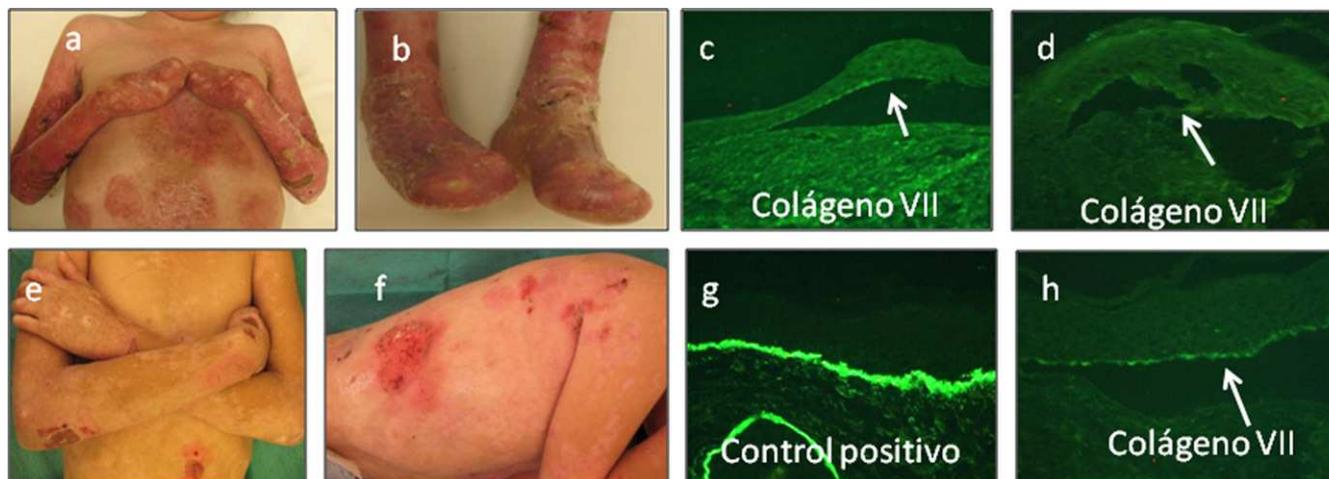


Figura 9 a y b) EADr-sev gen con pseudosindactilia completa en ambas manos y pies acompañada de contracturas. c y d) Ausencia completa de colágeno tipo VII (20 ×). e y f) EADr-O con ampollas, erosiones y cicatrices atróficas, en tórax y extremidades superiores. g) Control normal (20 ×) comparado con, h) una ampolla en dermis papila con colágeno tipo VII marcadamente reducido en intensidad (20 ×).

La inmunofluorescencia es la primera herramienta de laboratorio de utilidad para brindar asesoramiento a los padres y pacientes acerca del pronóstico clínico, fenotipo e historia natural de la enfermedad, con la ventaja de obtener el resultado el mismo día que se realiza la biopsia. Además, esta técnica puede realizarse más fácilmente en los hospitales, al no requerir técnicamente tanta preparación como la ME. La disponibilidad de medios de fijación de los tejidos (como la solución de Michel) que permiten además su transporte a centros especializados en esta patología, puede ayudar a los médicos que atienden a pacientes con EA, para poder realizar un primer diagnóstico de la enfermedad.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por la Cátedra de Hematología y Cáncer del Centro de Investigación Clínica, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Servicio de Patología, Hospital Universitario «Dr. José E. González» Universidad Autónoma de Nuevo León, DEBRA MEXICO AC, DEBRA AUSTRIA y DEBRA INTERNATIONAL.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Lanschuetzer CM. Definition. En: Fine JD, Hintner H, editores. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB)*. Austria: SpringerWien-NewYork; 2009. p. 3.
- Hertl M. Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;122: 91–100.
- Fine JD, Bauer EA, Briggaman RA, Carter DM, Eady RA, Esterly NB, et al. Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa: a consensus reported by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24:119–35.
- Lanschuetzer CM. Classification and molecular basis of hereditary epidermolysis bullosa. En: Fine JD, Hintner H, editores. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB)*. Austria: SpringerWien-NewYork; 2009. p. 6.
- Hintner H, Stingl G, Schuler G, Fritsch P, Stanley J, Katz S, et al. Immunofluorescence mapping of antigenic determinants within the dermal-epidermal junction in the mechanobullous diseases. *J Invest Dermatol*. 1981;76:113–8.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:931–50.
- Yiasemides E, Walton J, Marr P, Villanueva EV, Murrell DF. A comparative study between transmission electron microscopy and immunofluorescence mapping in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am J Dermatopathol*. 2006;28:387–94.
- Shwayder T, Akland T. Neonatal skin barrier: structure, function, and disorders. *Dermatologic Therapy*. 2005;18: 87–103.
- Nischler E, Klausegger A, Hüttner C, Gabriele Pohla-Gubo A, Diem A, Bauer JW, et al. Diagnostic pitfalls in newborns and babies with blisters and erosions. *Dermatology Research and Practice*. 2009;2009:10. Article ID 320403.
- Eming R, Hertl M; Autoimmune Diagnostics Working Group. Autoimmune bullous disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44:144–9.
- Schuilenga-Hut PH, Vlies P, Jonkman MF, Waanders E, Buys CH, Scheffer H. Mutation analysis of the entire keratin 5 and 14 genes in patients with epidermolysis bullosa simplex and identification of novel mutations. *Hum Mutat*. 2003;21:447.
- Campos Domínguez M, Suárez Fernández R, Lázaro Ochaíta P. Diagnostic methods in autoimmune subepidermal bullous diseases. *Actas Dermosifiliogr*. 2006;97:485–502.
- Laimer M. Routine histopathology in epidermolysis bullosa. En: Fine JD, Hintner H, editores. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB)*. Austria: SpringerWienNewYork; 2009. p. 30–4.
- Eady RA. Electron microscopy for the diagnosis of epidermolysis bullosa. En: Fine JD, Hintner H, editores. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB)*. Austria: SpringerWienNewYork; 2009. p. 43–53.

15. Uitto J, Richard G. Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;131C:61–74.
16. Babin S, Cabrini S, Dhuey S, Harteneck B, Machin M, Martynov A, et al. Fabrication of 20 nm patterns for automatic measurement of electron beam size using BEAMETR technique. *Microelectron Eng.* 2009, doi: 10.1016/j.mee.2008.11.074. in press.
17. Pohla-Gubo G, Nischler E, Hinter H. Antigen mapping. En: Fine Jo-David, Hintner Helmut, editores. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB).* Austria: SpringerWienNewYork; 2009. p. 35–42.
18. Michel B, Milner Y, David K. Preservation of tissue-fixed immunoglobulins in skin biopsies of patients with lupus erythematosus and bullous diseases. *J Invest Dermatol.* 1973;59:449.
19. Vaughan Jones SA, Bhogal BS, Black MM. The use of Michel's transport media for immunofluorescence and immunoelectron microscopy in autoimmune bullous diseases. *J Cutan Pathol.* 1995;22:365–70.
20. Sorelli P, Gratian MJ, Bhogal BS, McGrath JA. Immunogold electron microscopy using skin in Michel's medium intended for immunofluorescence analysis. *Clin Dermatol.* 2001;19:638–41.
21. Vodegel RM, de Jong MC, Meijer HJ, Weytingh MB, Pas HH, Jonkman MF. Enhanced diagnostic immunofluorescence using biopsies transported in saline. *BMC Dermatol.* 2004;4:10.
22. Woollons A, Holmes GJ, Gratian MJ, Bhogal BS, Black MM. Michel's medium: a potential alternative to cryoprotection for tissue transport in the investigation of genetic skin disease. *Clin Exp Dermatol.* 1999;24:487–9.
23. Briggaman RA. Structural changes of the dermoepidermal junction in epidermolysis bullosa. In: Piestley GC, Tidman MJ, Weiss JB, Eady RAJ, editores. *Epidermolysis bullosa: a comprehensive review of classification, management, and laboratory studies*, vol. 12. Crowthorne, UK: DEBRA; 1990. p. 50–61.
24. Wasel N, Idikio H, Lees G, Krol A, Lin AN. Junctional epidermolysis bullosa with pyloric stenosis presenting with electron microscopic findings suggestive of epidermolysis bullosa simplex. *Pediatr Dermatol.* 2000;17:395–8.
25. Petronius D, Bergman R, Ben Izhak O, Leiba R, Sprecher E. A comparative study of immunohistochemistry and electron microscopy used in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am J Dermatopathol.* 2003;25:198–203.
26. Yiasemides E, Trisnowati N, Su J, Dang N, Klingberg S, Marr P, et al. Clinical heterogeneity in recessive epidermolysis bullosa due to mutations in the keratin 14 gene, KRT14. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33:689–97.
27. Koss-Harnes D, Høyheim B, Anton-Lamprecht I, Gjesti A, Jørgensen RS, Jahnsen FL, et al. A site-specific plectin mutation causes dominant epidermolysis bullosa simplex ogra: two identical de novo mutations. *J Invest Dermatol.* 2002; 118:87–93.
28. Pfindner Ellen G, Lucky Anne W. Epidermolysis bullosa with pyloric atresia. In: GeneReviews. Initial Posting: August 21, 2006. Last Revision: October 4, 2007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=ebd>.
29. Pfindner EG, Lucky AW. Junctional Epidermolysis Bullosa. In: GeneReviews. Initial Posting: February 22, 2008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=ebj>.
30. Pfindner EG, Lucky AW. Dystrophic Epidermolysis Bullosa. In: GeneReviews. Initial Posting: August 21, 2006. Last Revision: October 4, 2007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=ebd>.