

Conceptos recientes en la inmunopatología cutánea

Current Concepts in Immunopathology of the Skin

M. A. Robledo Prada^a, L. A. Díaz^b

^aMedellín. Colombia. ^bDepartment of Dermatology. University of North Carolina School of Medicine. Chapel Hill. Estados Unidos.

Correspondencia:

Luis A. Díaz, M.D. Department of Dermatology, University of North Carolina School of Medicine, Suite 3100, Thurston Bldg., CB 7287, Chapel Hill, NC 27599-7287. Tel.: (919)843-7226 Fax: (919)843-5766
Correo electrónico: ldiaz@med.unc.edu

Resumen

Esta revisión abarca la información científica más relevante sobre la inmunopatología de las enfermedades autoinmunes ampollosas, el liquen *rubber* plano y lupus. La inmunofluorescencia fue la primera herramienta usada como ayuda diagnóstica y a veces, pronóstica en las enfermedades autoinmunes cutáneas y aun continua siendo de gran ayuda para los clínicos. Al emplear antígenos recombinantes y adaptar técnicas de tipo ensayo inmunoenzimático (ELISA), de inmunoprecipitación y de "immunoblotting" se aclaró la clasificación de estas enfermedades autoinmunes. Con ELISA se hacen diaria y simultáneamente diagnósticos en gran número de muestras, siendo los resultados rápidos, precisos y cuantitativos. Los recientes conocimientos en pénfigo como son las interacciones en la comunicación de los linfocitos T y B, además del reconocimiento de los epitópes de las desmogleinas, han dado base para

Palabras clave: inmunodermatología, autoinmunidad, pénfigo, penfigoide, dermatitis herpetiforme, inmunofluorescencia, ELISA.

Summary

This review covers the most relevant scientific information on the immunopathology of the autoimmune blistering diseases, lichen planus and lupus. Emphasis has been placed on the description of the immunoassays that are important and practical for the diagnosis of these diseases. The immunofluorescence techniques continue to be important diagnostic tests available to most clinicians. They provide diagnostic, and in some cases prognostic information, useful in the management of these diseases, e.g. pemphigus. The molecular characterization of the cutaneous antigens that constitute autoantibodies targets and that are present in these autoimmune diseases have allowed investigators to develop newer assays, such as ELISA, immunoprecipitation and immunoblotting, all applicable to the precise diagnosis of each disease. The use of recombinant skin antigens to test the responses of the patients T and B lymphocytes will provide important new information on the pathogenesis of these diseases.

Key words: immunodermatology, autoimmunity, pemphigus, pemphigoid, dermatitis herpetiformis, immunofluorescence, and ELISA.

Listado de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxi-ribonucleico	ELISA:	Ensayo inmunoenzimático ("Enzyme linked Immunosorbent Assay")	LES:	Lupus eritematoso sistémico
Ala:	Aminácido alanina	EAA:	Epidermolisis ampollosa adquirida	LED:	Lupus eritematoso discoide
ANA:	Anticuerpos antinucleares	EC:	Enfermedad celiaca	M:	tegumentario
Anti- Sm:	Anticuerpos Smith	EACI:	Enfermedad ampollosa crónica de la infancia	mM:	Molar
ANE:	Antígenos nucleares extractables	HLA:	Antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad	NC16A:	Milimolar
C3:	Factor 3 del complemento	His:	Aminoácido histidina	PA:	Dominio no colagenoso de 16 aminoácidos
CD4:	Linfocitos T ayudadores del grupo de diferenciación	HG:	Herpes gestationis ó penfigoide de la gestación	PA180:	Penfigoide ampolloso
Cys:	Aminoácido cisteína	IF:	Inmuno fluorescencia	PA230:	Antígeno de 180 kD del penfigoide ampolloso
Dsg:	Desmogleina	IFD:	Inmuno fluorescencia directa	PA:	Penfigo vulgar
DPS:	Dermatosis pustular subcornea	IFI:	Inmuno fluorescencia indirecta	PF:	Penfigo foliáceo
DNI:	Dermatosis neutrofílica intraepidérmica	Ig:	Immunoglobulina	PH:	Penfigo herpetiforme
DDS:	Diamino difenil sulfona	KD:	Kilodalton	PigA:	Pénfigo immunoglobulina A
DL IgA:	Dermatosis lineal IgA	Linfocito T:	Linfocito timo dependiente	PP:	Pénfigo paraneoplásico
DH:	Dermatitis herpetiforme (enfermedad de Dürhing)	Linfocito B:	Linfocito bursa dependiente	PID:	Pénfigo inducido por drogas
dcADN:	Ácido desoxi-ribonucleico de doble cadena o nativo	LA:	Lupus ampolloso	PC:	Penfigoide cicatricial
DO:	Densidad óptica	LRP:	Liquen rojo plano	TGt:	Transglutaminasa tisular
				ZMB:	Zona de la membrana basal

En 1941 Coons y colaboradores desarrollaron la técnica de la inmunofluorescencia (IF). Este hecho hizo posible que podámos observar microscópicamente la relación de antígenos y anticuerpos en su entorno tisular o en extendidos celulares, usando para ello los fluorocromos y el microscopio de luz ultravioleta [1,2]. Al comienzo, los esfuerzos se centraron en la purificación de los anticuerpos específicos, en la tecnología de la microscopía fluorescente y en mejorar la sensibilidad en la fotografía. La síntesis química de marcadores de alta calidad como el isotiocianato de fluoresceína, el isotiocianato de tetrametilrodamina y la ficoeritrina; junto con crióstatos más precisos en sus cortes y la fabricación de microscopios de fluorescencia tanto de transmisión como de epiluminiscencia, contribuyeron en el desarrollo de estas técnicas fluorescentes [3,4,5,6,7].

En 1966, Nakane, Pierce y Avrameas describieron las técnicas con anticuerpos marcados con enzimas para su uso en tejidos y con ellas fue posible mejorar los estudios en cortes con parafina, además de la microscopía electrónica [8,9]. Aparecieron marcadores como la peroxidasa de rábano, la ferritina y otros como oro, plata, radioisótopos y el fago-T4 [10,11,12,13]. Luego se desarrollaron varios métodos como la peroxidasa anti-peroxidasa, el del complejo avidina-biotina y el de la Proteína A que mejoraron la sensibilidad [10,14,15].

Desde los años 60, Beutner, Jordon, Burnham y otros cambiaron el curso de la práctica dermatológica al demostrar que existían inmunoreactantes en la piel de pacientes que sufrían pénfigo, penfigoide ampolloso y lupus eritematoso usando las técnicas de inmunofluorescencia [16,17,18]. Con esos descubrimientos se logró una mejor aproximación en el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico de éstas y muchas otras enfermedades autoinmunes. A partir de este conocimiento se han podido identificar y caracterizar muchas de las estructuras y componentes celulares y extracelulares pudiendo comprender mejor la estructura y funcionamiento de la piel.

Para el comienzo de los 70 se desarrolló la técnica de ensayo inmunoenzimático o ELISA, del inglés "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", que sigue una metodología parecida a la descrita por Nakane y Pierce pero en este caso, los antígeno o los anticuerpos se fijan a pozos de platos de poliestireno y las lecturas se hacen de acuerdo con la intensidad del color de la reacción, usando para su lectura inspección visual o espectrofotómetros con densitometría de reflexión [19,20,21].

En 1975 Kohler y Milstein produjeron los anticuerpos monoclonales, al fusionar células de mieloma con linfocitos del bazo de un ratón inmunizado con un antígeno específico ya conocido, ampliándose el campo de investigación y de diagnóstico en áreas como la patología, microbiología, inmunología y la genética [22].

En las décadas de los 80 y 90 aparecieron las técnicas de biología molecular con la clonación de genes y la manipulación del ácido desoxi-ribonucleico (ADN) [23], siendo posible conocer y purificar las proteínas (antígenos) comprometidos en

estos trastornos autoinmunes, tales como son las proteínas de desmosomas, hemidesmosomas y otras matrices proteicas de unión y reproducirlas expresándolas como proteínas recombinantes que se obtienen a partir de vectores virales, como el baculovirus o bacterianos o, inclusive, en células como las COS-7. La más usada es la técnica de los baculovirus descrita por Liebman y cols [24]. Las proteínas producidas se purifican por cromatografía de afinidad con níquel según el método de Ding y cols [25]. En los 90 se retomaron y modernizaron las técnicas de ELISA y la de inmunoprecipitación usando para tal fin sueros de pacientes y como antígenos dichas proteínas recombinantes, revolucionando así no solo los métodos diagnósticos sino el conocimiento de las bases moleculares de la fisiología y fisiopatología cutánea [26,27].

El objetivo de esta revisión es presentar los nuevos conocimientos sobre la inmunopatología cutánea y el significado de las diferentes técnicas diagnósticas usadas en las enfermedades autoinmunes de la piel como son las enfermedades autoinmunes ampollosas, el liquen plano y el lupus pero dejando a un lado las vasculitis y otras enfermedades del colágeno.

Técnicas de inmunofluorescencia

Se usan dos métodos, la inmunofluorescencia directa y la inmunofluorescencia indirecta:

Inmunofluorescencia directa (IFD)

Busca especialmente proteínas tisulares o anticuerpos que se han fijado *in vivo* sobre los tejidos usando diferentes anticuerpos marcados con un fluorocromo, siendo el más común el isotiocianato de fluoresceína; su lectura se realiza en el microscopio de luz ultravioleta. Sus aplicaciones diagnósticas más frecuentes en dermatología, aparte de las enfermedades infecciosas y algunas genéticas, son las enfermedades autoinmunes vesicoampollosas, todas las formas de lupus eritematoso y las vasculitis. A partir de las biopsias obtenidas de piel perilesional para las enfermedades ampollosas y lesionales en las otras entidades, los especímenes son cortados en crióstato. Los tejidos pueden ser cortados directamente en fresco o pueden ser enviados en el medio de transporte de Michel, que fija las inmunoglobulinas (Ig) al tejido [28]. En un único paso, se incuban los cortes del tejido por media hora con los reactantes deseados siendo los más usados: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anticomplemento C3 y antifibrinógeno, marcados con el fluorocromo. Cada uno de los reactantes debe ser probado por separado con sus respectivos controles. Posteriormente se lava la muestra con un tampón fosfato salino, se usa un medio de montaje para cubrir las muestras con la laminilla, quedando así listas para su lectura al microscopio [29].

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se usa en inmunodermatología, especialmente para estudios serológicos de enfermedades auto-inmunes ampollosas. Su técnica consiste en, a partir de cortes de tejido o de células

normales que contengan los antígenos deseados, se incuban los sueros problema a diferentes diluciones, luego de lavar con un tampón salino, para posteriormente incubar con las anti-Ig marcadas con el fluorocromo. Se repiten los lavados y para su lectura se montan igual a la IFD. Todas las pruebas deben tener un control positivo y uno negativo para que tengan un valor confiable [28]. Una variante es la IFI con piel separada con sal, la que induce a nivel de la lámina lucida, una ampolla subepidérmica que permite diferenciar la localización de antígenos de la zona de la membrana basal (ZMB); esta separación se obtiene al hacer un pre-tratamiento de la piel normal con una solución de cloruro de sodio al 1 M por 72 horas [30].

Técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Estos nuevos métodos de ELISA usan antígenos recombinantes como la Desmogleina 1 (Dsg1), Desmogleina 3 (Dsg3), colágeno VII (antígeno de la epidermolisis ampollosa adquirida (EAA)), antígeno de penfigoide ampolloso 180 (PA180) y antígeno de penfigoide ampolloso 230 (PA230). Estos antígenos se adhieren al fondo de los pozos de los platos de poliestireno recubiertos con níquel-ácido nitrilotriacético (Qiagen, Chatsworth, Calif.), luego se agregan los sueros de pacientes a diluciones de 1:200, se incuban por una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, se lavan tres veces y con TRIS tampón salino (pH 7.2), con 3.7 mM de calcio, se incuban luego otra hora con una dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG humana marcado con un conjugado de peroxidasa (MBL, Nagoya, Japón). Después del segundo lavado se revela el color con 1.6 mmol/L de tetrametilbenzidina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) en 10 mM de citrato de sodio, 1.25% polietilenglicol 4000 y 10 mM de peróxido de hidrógeno y se termina con H2SO4. Cada uno de los sueros de las distintas enfermedades fueron seleccionados y estandarizados para cada ELISA. El índice de corte es calculado de acuerdo a la fórmula: Valor índice = (Densidad Óptica (DO) muestra - DO negativo/DO positivo - DO negativo)* 100. Por ejemplo para Dsg1 el índice de valor de corte es de 11.0 y para Dsg3 de 10.0. Índices de valor entre el corte y 20 se consideran zona gris y los mayores de 20 son positivos [26,27,31,32].

Inmunopatología de las enfermedades autoinmunes ampollosas

Pénfigos

Todas las formas adquiridas de pénfigo son enfermedades autoinmunes ampollosas que se caracterizan clínicamente por presentar ampollas, erosiones de piel y/o mucosas y presentar signo de Nikolski positivo (tendencia de la ampolla a extenderse hacia la periferia al hacer presión sobre ella) e histológicamente presentan acantolisis. La inmunopatología muestra un patrón intercelular que se ha denominado como en “panal de abeja”; este patrón está dado tanto en la IFD como en la IFI por autoanticuerpos contra componentes de los desmosomas de

los queratinocitos [33]. Las evidencias experimentales usando transferencia pasiva de los autoanticuerpos de pénfigo vulgar (PV) y de pénfigo foliáceo (PF) a ratones neonatos o ratones BALB/c demostraron que los anticuerpos son los causantes directos de la acantolisis al interferir con la función del desmosoma [34,35]. Los antígenos son proteínas del grupo de las caderinas que son moléculas de adhesión de los desmosomas. Las caderinas del desmosoma se denominan desmogleinas (Dsg)1, 2 y 3, las desmocolinas 1 y 2. Solo la Dsg1 y Dsg3 están involucradas en la fisiopatología de los pénfigos, no así la Dsg2 que tiene una distribución más generalizada, abarcando los desmosomas de otros tejidos como el tejido miocárdico [36,37]. Para el PV de compromiso mucoso, el antígeno es solo la Dsg3; para la forma mucocutánea de PV son las proteínas Dsg1 y Dsg3 y en el PF solo la Dsg1, tanto para forma no endémica como para la endémica [38,39,40]. A partir de estos conocimientos se han podido correlacionar los hallazgos con las manifestaciones clínicas y se ha visto que la Dsg1 se encuentra en mayor proporción en pacientes de origen americano que en europeos del norte. Por otra parte, la presencia de la Dsg1 sugiere una enfermedad potencialmente más severa en PV. Los sitios de las acantolisis suprabasal en PV o subcornea en PF, dependen respectivamente de la localización en los epitelios de los antígenos Dsg3 o Dsg1 [41,42,43]. En el pénfigo herpetiforme se demostró que puede ser una variante de ambos, tanto del PF, en su mayoría, como también del PV [44]. En pénfigo IgA se reconocieron principalmente anticuerpos contra desmocolina 1 y escasos a Dsg1 y Dsg3 [45]. El pénfigo paraneoplásico presenta múltiples proteínas del grupo de las caderinas como delas plaquinas como

Tabla 1. Características de los pénfigos en la inmunofluorescencia directa (IFD), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y/u otro método para detectar antígenos. (IF: Patrón intercelular intraepidérmico)

Entidad	IFD	IFI	ELISA y/u otro método
Pénfigo vulgar	IgG & C3 73-92% IgM (Pocos)	IgG 94- 100%* IgG 100%	Dsg3 en el mucoso puro Dsg1 + Dsg3 en el mucocutáneo
Pénfigo foliáceo (no endémico y epidémico)	IgG 90- 100%	IgG 100%*	Dsg1 > 98%
Pénfigo herpetiforme	IgG	IgG	Dsg1 70% Dsg3 30%
Pénfigo IgA (DPS-DNI)	IgA	IgA 50%	Dsg1 (3/22) 13,6% Dsg3 (1/22) 4,5% Desmocolina 1 100%
Pénfigo paraneoplásico	IgG (intae- pidérmico) C3, IgG & IgM (en ZMB)	IgG 75%	Caderinas y plaquinas
Pénfigo inducido por drogas	IgG 90%	IgG 70%	Dsg1 (2/3) Dsg3 (1/3)

*Títulos de valor pronóstico

son la 160 kD Dsg1 y 130kD Dsg3, la desmoplaquina, antígeno 1 de penfigoide ampolloso o PA230, envoplaquina, plectina, [46,47]. En el pénfigo inducido por drogas la mayoría de los casos reaccionan a la Dsg1 mientras que otros lo hacen a la Dsg3 aunque en un número escaso no se detectan autoanticuerpos [48]. (Tabla 1).

Pénfigo vulgar (PV). El PV tiene ampollas flácidas en piel normal o eritematosa que dejan áreas denudadas, presentan el signo de Nikolski y tiene compromiso mucoso muy frecuente. Histológicamente hay también acantolisis suprabasal denominada en “muro derruido”. En la IFD hay depósitos intercelulares de IgG, C3 y a veces IgM. En la IFI se detectan autoanticuerpos circulantes IgG que muestran un patrón intercelular siendo el esófago de mono o la piel humana de prepucio los tejidos más usados como sustratos. La IFI es de valor pronóstico y sirve para seguimiento en la terapia. El pénfigo vegetante con sus dos tipos Neuman (con ampolla inicial) y Hallopeau (con pústulas al inicio) son variantes raras y más benignas que el PV. Las lesiones iniciales son seguidas de formaciones verrucosas vegetantes en áreas intertriginosas. Los cambios histológicos muestran acantolisis similar a la del PV pero con papilomatosis; hay hiperqueratosis e infiltrado de eosinófilos. Las biopsias por IFD muestran entre un 45 a 90% depósitos de IgG, entre un 80 a 100% de C3 y en pocos casos de IgA acompañando a las anteriores. La IFI usando como sustrato esófago de mono detecta autoanticuerpos IgG en un 94% de los casos, siendo de valor tanto en el pronóstico como en el seguimiento de la terapia [49,50]. Un estudio reciente sugiere el uso de dos sustratos, tanto el esófago de mono como la piel humana normal para aumentar la sensibilidad al 100%. En las pruebas de inmunofluorescencia el diagnóstico está basado en que el esófago de mono tiene más Dsg3 y detecta mejor los PV mientras la piel humana tiene más Dsg1, siendo más sensible para el PF. Como es sabido, la técnica de inmunofluorescencia no diferencia entre las variantes clínicas de pénfigos pero con el uso de los dos sustratos se podría ayudar un poco en la diferenciación y en el monitoreo de la enfermedad para aquellos laboratorios que aun no pueden hacer las pruebas de ELISA [51]. Con el advenimiento de las técnicas modernas de ELISA con antígenos recombinantes Dsg1 y Dsg3 se han podido diferenciar las clases de pénfigos; en el caso del PV de predominio mucoso solo se detecta autoanticuerpos anti-Dsg3 y en el caso de PV mucocutáneo, las pruebas son positivas tanto para la Dsg1 como para la Dsg3 [39]. Fue posible detectar células B antígeno-específicas Dsg3 por medio de “enzyme linked immunospot assay” en sangre periférica de pacientes con enfermedad severa, no así en enfermedad leve, en remisión o en controles sanos. Si se combina el método anterior con estimulación de linfocitos mononucleares de sangre periférica con mitógeno “pokeweed” y Dsg3 recombinante, fue posible detectar células B de memoria en 9 de 14 pacientes con PV y en ninguno control sano. Si en el mis-

mo experimento se suprimían los linfocitos CD4+ o si a los cultivos se les agregaban anticuerpos monoclonales anti HLA-DR o anti HLA-DQ, se detenía la activación y la memoria de las células específicas B Dsg3. Estos hallazgos son muy claros para entender la importancia que juega el complejo HLA clase II, restringido a linfocitos T CD4+, en la producción de autoanticuerpos en PV [52]. A partir de técnicas de biología molecular que permitían localizar los epítopes conformacionales de las Dsg1 y Dsg3, fue posible encontrar que las porciones N-terminales de los dominios extracelulares de la superficie de adhesión de ambas proteínas tenían estructuras similares aunque epítopes distintos. Se crearon moléculas mutantes cambiando las dos porciones N-terminal y por ELISA de competencia se notó que más del 50% de los sueros de PF y PV competían entre si. Además, por inmuno-absorción de los anticuerpos con 161 residuos de la porción N-terminal de la Dsg1, se eliminó la habilidad de inducir la acantolisis en ratones neonatos, llegando de esta manera a definir uno de los epítopes de la Dsg1 (His [25], Cys [28], Ala [29])[53].

Pénfigo foliáceo (PF). Está representado por sus variantes no endémico o eritematoso y endémico o “fogo selvagem.” Ambos se caracterizan por presentar ampollas flácidas, a veces con pústulas cubiertas por áreas costrosas, mal olientes, de predominio en áreas seborreicas que respetan las mucosas. Histológicamente se observan ampollas acantolíticas subcorneas. En la IFD hay depósitos intercelulares epidérmicos de IgG en 90 a 100% de los casos, las que se localizan en todas las capas del estrato epidérmico. La IFI con IgG es altamente positiva alrededor del 100%, y de valor pronóstico como en el PV, siendo los sustratos más usados piel humana de prepucio y labio de conejillo de indias [48,54]. Con las técnicas de inmunoprecipitación y luego con ELISA se encontró que en PF tanto en el tipo no endémico como en el endémico, 98% ó más de los pacientes reconocen solamente el antígeno de la Dsg1 una glicoproteína de 160 kD. En áreas brasileras donde el PF es prevalente se encontraron sueros positivos entre el 19 y el 55% de sujetos normales. Además, en cinco individuos se encontraron autoanticuerpos anti Dsg1 al usar la prueba de ELISA, 1-5 años antes del inicio de la enfermedad; cuando la enfermedad se hizo clínicamente aparente, se anotó un incremento marcado de los títulos de tales auto-anticuerpos [55,56]. Recientemente, Amagai explica como la formación de ampollas acantolíticas idénticas histológicamente en PF y en el síndrome de piel escaldada estafilococcica comparten como molécula blanco la Dsg 1, pero con mecanismos fisiopatológicos diferentes, en el caso de PF los autoanticuerpos se dirigen en contra de la Dsg1, produciendo la acantolisis, y en el síndrome de piel escaldada estafilococcica, *Staphylococcus aureus* produce una toxina epidermolítica que se une a la Dsg1 rompiéndola en el mismo sitio que lo hacen los anticuerpos del PF [57].

Pénfigo herpetiforme (PH). Clínicamente se observan lesiones eritemato-vesico-ampollosas o papulares, muy pruriginosas, con un patrón herpetiforme semejante a la dermatitis herpetiforme y ocasionalmente también lesiones mucosas. Inmunopatológicamente PH se considera una variante bien sea del PV o del PF. Las características histológicas están representadas por espongiosis eosinofílica con o sin acantolisis, y por pústulas intraepidérmicas con eosinófilos y neutrófilos. En IFD se observan depósitos de IgG intercelulares en la parte superior o en todo el epitelio, mientras que en la IFI se detectan anticuerpos circulantes tipo IgG, epidérmicos intercelulares, indistinguibles de las formas anteriores PV y PF. Se considera que el pénfigo herpetiforme es una variante del PF en un 70% con Dsg1 y del PV en un 30% con Dsg3 [44,58,59,60].

Pénfigo IgA (P IgA). En la clínica encontramos vesículas y/o pústulas flácidas con un patrón anular y centro costoso, con raro compromiso mucoso. Histológicamente se conocen dos tipos, la dermatosis pustular subcornea (DPS) de Sneddon y Wilkinson y la dermatosis neutrofílica intraepidérmica (DNI). En la IFD, la DPS muestra depósitos intercelulares de IgA en el área subcornea o superior del epitelio mientras que en la DNI los depósitos se encuentran en todo el epitelio, pero fundamentalmente hacia la base. En las dos formas de la enfermedad la IFI detecta autoanticuerpos circulantes tipo IgA epidérmicos e intercelulares en un 50% de los casos. Mediante ELISA se ha determinado que en 3 de 22 casos de pénfigo IgA, los sueros reconocen antígenos recombinantes Dsg1 mientras que solo 1 de 22 reconoció la Dsg3. Todos los casos de DPS tipo IgA reconocieron la Desmocolina 1 expresada en células COS-7. Esto hace suponer que los antígenos en pénfigo IgA son más heterogéneos de lo que se había pensado [60,61,62,63].

Pénfigo paraneoplásico (PP). Caracterizado por erupciones polimorfas de la piel con ampollas, lesiones erosionadas en tiro de diana y compromiso mucoso severo; se presenta en pacientes que tienen una neoplasia de base especialmente trastornos hematológicos como linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica, enfermedad de Castleman o sarcomas mal diferenciados. Una variante localizada de PP asociado a melanoma se ha descrito recientemente. Histológicamente se presenta con acantolisis suprabasal e intra epidérmica, necrosis de queratinocitos y disqueratosis con infiltrados mononucleares liquenoides. En la IFD se observan depósitos de IgG en todo el epitelio y en pocos casos IgA. Con complemento, IgG e IgM se detectan depósitos lineales y granulares a lo largo de la zona basal y de la superficie de las células epidérmicas. En 75% de los casos la IFI detecta autoanticuerpos circulantes IgG, dirigidos contra la superficie de las células transicionales de vejiga de rata [64,65,66,67]. La técnica especial de IFI para detectar fijación de complemento humano por anticuerpos de pacientes con PP que utiliza como sustrato esófago de mono, detecta un patrón de anticuerpos de superficie celular y permite correla-

cionar los resultados positivos con formas letales del PP, y las pruebas negativas con formas de larga sobrevida del PP, PV Y PF, [68]. Todos los pacientes con PP presentan IgG anti Dsg3 circulante detectada por ELISA, como ocurre en PV. Además de IgG anti Dsg1 como en PF a estos pacientes con PP se les ha podido detectar también anticuerpos contra múltiples antígenos, como son los de la familia de las plaquinas (desmoplaquina I, II, PA230, envoplaquina, periplaquina y HD1/plectina), [46,47, 69, 70,71,72].

Pénfigo inducido por drogas (PID). Es una entidad rara, heterogénea, en la que la mayoría de los pacientes presentan manifestaciones clínicas, histológicas e inmunológicas idénticas a las formas idiopáticas de pénfigo. Las drogas que más frecuentemente se asocian son la penicilamina y el captoril. Aproximadamente en dos terceras partes de los pacientes con PID, se detectan anticuerpos anti Dsg1, igual al PF; en un tercio de ellos hay anti Dsg3 como en el PV. En la IFD se detectan en 90% de los pacientes IgG con la IFI se encuentran en un 70% de casos siendo los títulos son bajos y sin correlación con la clínica. En el bajo porcentaje donde ambas pruebas son negativas, se sospecha que la acantolisis sea mediada directamente por toxicidad de la droga sin participación de la respuesta inmune [48,73,74,75,76].

Penfigoides

Los penfigoides son enfermedades autoinmunes que se caracterizan por presentar ampollas subepidérmicas por encima de la lámina densa. La inmunofluorescencia muestra un patrón lineal con depósitos de IgG y de C3 en la zona de la membrana basal [77]. A diferencia de los pénfigos donde los anticuerpos son los directamente responsables de la acantolisis, en este

Tabla 2. Características de los penfigoides en la inmunofluorescencia directa (IFD), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y/u otro método para detectar antígenos. (IF: Patrón lineal en la ZMB, IFI separada con sal positivo en el techo de la ampolla).

Entidad	IFD	IFI*	ELISA y/u otro método.
Penfigoide ampolloso	IgG 45-90% C3 80-100% IgA (pocos)	IG 70% IgA & IgE (escasos)	230 kD (Ag 1 de PA) 180 kD (Colágeno XVII)
Penfigoide de la gestación	C3 90% - 100% IgG 25%	Negativa o débil Factor HG 50%	180 kD (Colágeno XVII)
Penfigoide cicatricial	IgG & C3 90% IgA 80% IgM 70%	IgG 10 a 90% IgA & IgM variable. Dependen todas del sustrato.	180 kD en la mayoría Laminina 5 y 6, colágeno VII en la minoría

* Los títulos no son de valor pronóstico.

grupo de enfermedades con ampollas subepidérmicas su formación es inducida por la activación del proceso inflamatorio [78,79]. Tres entidades pertenecen a este grupo [Tabla 2]:

Penigoide ampolloso (PA). PA y “Herpes gestationis” (HG) son enfermedades con manifestaciones similares que incluyen lesiones urticiformes que progresan a ampollas tensas y que dejan áreas denudadas. Generalmente no presentan el signo de Nikolski. Histológicamente se caracterizan por presentar ampollas subepidérmicas, sin acantólisis, con infiltrado de linfocitos, eosinófilos y escasos polimorfonucleados en la ampolla misma y en la dermis superficial. En un 45–90% de los casos la IFD detecta depósitos lineales de IgG en la ZMB y en un 80 a 100% de ellos depósitos de C3, aunque otras inmunoglobulinas pueden estar presentes. En la IFI con piel separada con sal, un 70% de los pacientes presentan IgG circulante que se fija al techo de la ampolla, no siendo éstas de valor pronóstico. En algunas ocasiones otras inmunoglobulinas como la IgA y la IgE pueden también ser detectadas [77]. Por “immunoblotting”, PA reconoce antígenos de 230 kD de los hemidesmosomas, el así llamado antígeno 1 del PA (PA230) y además, otra proteína de 180 kD (PA180) que también se denomina colágeno XVII [79,80]. Los anticuerpos de PA y HG reconocen un sitio común del dominio no colagenoso de 16 aminoácidos (NC16A) de la proteína de 180 kD [81]. Las pruebas de ELISA se han establecido con el antígeno recombinante de 180 kD obtenido en vectores bacterianos o en baculovirus, lo que permite obtener pruebas positivas hasta en un 67.5% de los pacientes [83,84].

Herpes gestationis (HG) ó penigoide de la gestación. HG se distingue del PA por su asociación con el embarazo, puerperio o desórdenes hormonales. La histopatología es igual a la del PA aunque en muchas oportunidades los cambios son

Tabla 3. Características de la epidermolisis ampollosa adquirida (EAA) y del lupus ampolloso en la inmunofluorescencia directa (IFD), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y/u otro método para detectar antígenos.
(IFI: Patrón lineal sub región lámina densa de ZMB, IFI con piel separada con sal positiva en el piso de la ampolla)

Entidad	IFD	IFI	ELISA y/u otro método.
Epidermolisis ampollosa adquirida	IgG 100% C3 en la mayoría IgA & IgM minoría	IgG 50%	Colágeno VII (290 kD)
Lupus ampolloso	Todas las IgG y C3 con patrones mixtos en ZMB y depósito en vasos dérmicos como en LES.	Patrón igual a la EAA.	Colágeno VII (290 kD), 230 kD (Ag 1 de PA), laminina 5 y 6

inespecíficos con infiltrados mixtos con eosinófilos y necrosis de células basales. En IFD la característica más importante la constituye la presencia de depósitos lineales de C3 en la ZMB en 90 a 100% de los casos, la IgG se observa en un 25% de ellos. Los títulos a la IFI son muy bajos y a menudo no se encuentran, a menos que se usen métodos especiales como la técnica para la detección del factor HG, que da pruebas positiva hasta en 50% de los casos. Para ella se usa la piel separada con sal, con adición de complemento activo de suero humano fresco y se termina con anticuerpo anticomplemento humano marcado con fluoresceína [85]. Por “immunoblotting”, HG solo reconoce la proteína de 180 kD y al igual que en PA y también reconocen un sitio común (NC16A) conocido como el colágeno XVIII, pero no se detecta la proteína de 230 kD o antígeno 1 del PA [82,86]. El antígeno de 180 kD ha sido producido en forma recombinante y usado en el diagnóstico por el método de ELISA, al igual que en PA [83,84].

Penigoide cicatricial (PC). Es una enfermedad ampollosa crónica autoinmune que compromete principalmente las membranas mucosas y ocasionalmente la piel. Dejan cicatrices que producen pérdida de la función de los órganos comprometidos. Histológicamente las lesiones tempranas muestran separaciones y vesículas subepidérmicas con infiltrado de linfocitos, plasmocitos, eosinófilos y neutrófilos, siendo estos últimos más abundantes que lo observado en PA. En la conjuntiva se pueden observar ocasionalmente infiltrados que dan la apariencia de tejido de granulación. En las áreas perilesionales mucosas la IFD detecta depósitos lineales de IgG y C3 en la membrana basal en un 90% de los casos, de IgA en 80% y de IgM en 70%; en la piel, tales depósitos se detectan en menor porcentaje. La IFI es muy variable detectando tanto IgG en la mayoría de los casos resultando positiva entre un 10 y 90%, dependiendo del sustrato que se use, mucosas o piel, también se detectaron IgA e IgM en menor frecuencia no siendo ninguna de ellas de valor pronóstico. Por “immunoblotting” la mayoría de pacientes con PC reconocen los mismos antígenos de 180 kD que el PA. Un número menor de pacientes reconocen otras proteínas como laminina 5 ó epilagrina laminina 6 Colágeno VII y otros antígenos [87,88,89].

Epidermolisis ampollosa adquirida (EAA) y lupus ampolloso (LA)

Estas dos enfermedades comparten autoanticuerpos, predominantemente de tipo IgG, contra el colágeno tipo VII, proteína de 290 kD que se localiza en la subregión de la lámina densa de la ZMB, donde produce ampollas subepidérmicas. Ambas entidades tienen una predisposición genética [90,91]. (Tabla 3).

Epidermolisis ampollosa adquirida (EAA). Es una enfermedad rara que no es de origen congénito como las demás epidermolisis, pero que se parece a la epidermolisis ampollosa

distrófica dominante. Clínicamente se caracteriza por fragilidad extrema de la piel y el trauma induce ampollas y erosiones, sin inflamación, que curan dejando cicatrices con milia. Las lesiones se localizan en áreas extensoras con compromiso distrófico de las uñas, alopecia cicatricial y compromiso mucoso que en algunas ocasiones, puede lesionar laringe y esófago resultando en estenosis de este órgano. Existen informes en los cuales al comienzo la enfermedad es muy variable, semejando otras de las enfermedades ampollosas como PA, DH, pénfigos o eritema multiforme. El cuadro histológico muestra ampollas subepidérmicas que no es posible diferenciar del PA por este método. La IFD de piel lesional o perilesional muestra depósitos lineales de IgG en la ZMB en todos los casos, así como de C3 en la mayoría de ellos. En algunos casos se han detectado otras Iggs como la IgA ó la IgM pero con menos intensidad. Aun con la IFD puede ser difícil de diferenciar la EAA de la PA. Con el uso de diferentes sustratos, la IFI detecta en un 50% depósitos lineales de IgG en la ZMB [90,91,92]. Para diferenciar EAA de otras entidades como PA que también tiene depósitos en la ZMB, es necesario usar piel separada con sal o biopsias por succión y con estas técnicas, PA muestra IF en el techo de la ampolla en los hemidesmosomas de las células basales mientras que EAA muestra los depósitos en el piso de la ampolla, en la dermis [93,94,95]. Recientemente se ha demostrado que los sueros de los pacientes con EAA reconocen como antígeno la porción carboxilo terminal del colágeno tipo VII, el que se encuentra localizado dentro de la membrana basal; para su localización se han usado técnicas de inmuno-microscopía electrónica con inmuno-oro. Por medio de técnicas de biología molecular y usando los sueros de los pacientes con EAA, se pudo purificar proteína recombinante del colágeno VII para luego desarrollar técnicas diagnósticas de ELISA [96,97,98].

Lupus ampolloso (LA). Como su nombre lo indica, esta forma de lupus es una enfermedad ampollosa subepidérmica

Tabla 4. Características de la dermatitis herpetiformis y la dermatosis linear IgA en la inmunofluorescencia directa (IFD), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y/u otro método para detectar antígenos.

(IF: IgA con patrones granulares, fibrilares o lineales en la dermis papilar)

Entidad	IFD	IFI	ELISA y/u otro método.
Dermatitis herpetiformis	IgA 100%	Negativa.	Endomisio Transglutamasa tisular 79%
Dermatosis linear IgA y enfermedad ampollosa crónica de la infancia	IgA Lineal 100% IgG y/o C3 raros	Raras veces positiva.	180 kD (colágeno XVII) y 230 kD

adquirida que cumple los criterios de la Asociación Americana de Reumatología para el diagnóstico de lupus. Clínicamente y en la mayoría de los pacientes, el proceso se manifiesta con erupciones vesico-ampolloosas generalizadas, no cicatriciales, pero en otros casos, hay cicatrices crónicas. Las lesiones no se limitan solo a las áreas expuestas al sol, por lo que se pueden ver comprometidas tanto áreas flexoras como extensoras y además compromiso mucoso de boca y faringe. En esta forma de lupus se pueden apreciar máculas y placas eritematosas con ampollas grandes y tensas como en PA, o en pequeños grupos como en DH. El prurito no es muy intenso pero puede estar presente y a veces es muy severo. Histológicamente las lesiones tempranas muestran separación dermopatológica en la ZMB, con acúmulos de neutrófilos en la dermis superior que se pueden confinar a la papila o dispersarse en la dermis. Además se pueden ver, aunque en menor número, monocitos y eosinófilos. En algunos casos se pueden observar también cuadros de vasculitis leucocitoclástica. A diferencia de EAA, LA es una enfermedad autolimitada y responde bien a la terapia con Diamino difenil sulfona (DDS). Es importante resaltar que el cuadro histológico inicial de las lesiones primarias del Lupus, como es la atrofia epidérmica, se presenta vacuolización de las células basales, engrosamiento de la membrana basal e inflamación crónica, cambios que están ausentes en el LA. La IFD de piel perilesional muestra en la ZMB depósitos de la mayoría de las inmunoglobulinas IgG, IgA, IGM y del complemento, con diferentes patrones, lineal o granular y mezcla de ambos. Ocasionalmente, pueden observarse depósitos de Iggs en las vérulas dérmicas como en otras formas de lupus. En la IFI los autoanticuerpos contra el colágeno tipo VII se fijan en forma lineal en la ZMB en la sublám-

Tabla 5. Características de los liquenes en la inmunofluorescencia directa (IFD), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y/u otro método para detectar antígenos.

(IFI: Solo la forma penfigoide es autoinmune con patrón lineal en ZMB igual al PA).

Entidad	IFD	IFI	ELISA y/u otro método. ELISA y/u otro método. *
Liquen <i>rubber</i> plano	No es específica cuerpos coloides de todas las Iggs, C3 y depósitos de fibrinógeno granulares y lineales en la ZMB	Negativa	Desconocido
Liquen plano ampolloso	No es específica	Negativa	Desconocido
Liquen plano penfigoide	IgG & C3 lineal en ZMB	Patrón igual al PA	Epitope MCW-4 del PA 180 (NC16A)

* Usando "immunoblotting"

na densa, de igual forma que lo hace la EAA [93,94]. Chan y col., encontraron que el LA reconoce multiples componentes de la ZMB como el ag 1 de PA, laminina 5 y laminina 6 además del colageno tipo VII [99].

Dermatitis herpetiforme (DH) y dermatosis linear IgA (DL IgA)

Inicialmente estas dos entidades se consideraron variantes de una sola enfermedad por compartir el mismo cuadro histológico pero después de algunos estudios, se logró un mejor entendimiento inmuno-patológico que las diferenció como entidades separadas; la DH se asocia a enteropatía por gluten, mientras que la DL IgA no lo hace. A la DH se le encuentran anticuerpos antigliadina y anticuerpos anti-endomisio de músculo liso que son un marcador de enteropatia al gluten; mientras en la DL IgA. se detectan como antígenos las proteínas de 97 kD y de 180 kD (el colágeno tipo XVII). En la terapia ambas enfermedades responden bien a la DDS [100,101]. (Tabla 4).

Dermatitis herpetiforme (DH). Clínicamente se observa erupción papulo-vesicular pruriginosa que compromete áreas extensoras, excepcionalmente se ven lesiones ampollosas semejantes al PA. La histopatología de las lesiones muestra vesículas en la unión dermoepidérmica con infiltrado de neutrófilos en la punta de las papilas de la dermis. Los hallazgos histológicos no son específicos pues se ven también en casos de PA, LA y DL IgA. La IFD positiva de piel perilesional es criterio diagnóstico al demostrarse anticuerpos IgA granulares en la dermis papilar. En la DH la IFI no detecta anticuerpos circulantes IgA en piel humana normal [100,101]. La enfermedad de Dürhing se refiere a la DH con enteropatía sensible al gluten, se diagnostica por atrofia vellosa y presencia de anticuerpos anti-endomisio, los cuales se encuentran también en la enfermedad celíaca (EC). Se ha demostrado que la transglutaminasa tisular (TGt) es el mayor auto-antígeno en la enteropatía sensible al gluten. Se han desarrollado pruebas de ELISA anti-TGt las que al ser comparadas con las inmunofluorescencias anti-endomisio, demostraron que ambos anticuerpos se detectan en la mayoría de los casos de DH (74-79%) y de EC (55-62%), si la dieta en gluten era normal pero si la dieta estaba libre de gluten por periodos muy prolongados, las pruebas se volvían negativas. Se confirmó la alta especificidad y sensibilidad de la ELISA en DH y EC. En DH, la ELISA anti-TGt fue más sensible que la fluorescencia anti-endomisio, pero se sugiere usar ambas pruebas en el diagnóstico de DH. En EC los títulos de IgA anti-TGt se encuentran en concentraciones significativamente mayores que en otras enfermedades gastrointestinales y se correlacionan, además, con anticuerpos anti-endomisio [102,103].

Dermatosis linear IgA (DL IgA). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son variables; hay presencia de pe-

queñas vesículas y hasta de grandes ampollas que no tienen un patrón especial de distribución. La enfermedad ampollosa crónica de la infancia (EACI) es considerada la contraparte infantil de la DL IgA del adulto. La histopatología es indistinguible a la observada en DH, se pueden observar aparte de los micro-abscesos papilares, infiltrados de eosinófilos en la dermis semejantes a los de PA. La IFD hace el diagnóstico al encontrarse depósitos lineares de IgA a nivel de la membrana basal; en algunos casos se pueden observar también depósitos IgG siendo raros los de C3. En raras oportunidades la IFI es positiva [100]. En la DL IgA y EACI los anticuerpos IgA reaccionan contra los mismos sitios o dominios NC16A del antígeno BP180 (colágeno tipo XVII) y de 230 kD, al cual reaccionan los anticuerpos IgG de los pacientes con penfigoide ampolloso [104,105].

Erupción ampollosa subepidérmica asociada a anticuerpos IgG contra antígeno subepidérmico de 200 KD

Solo se han informado cinco casos en la literatura de esta nueva entidad autoinmune ampollosa. Clínicamente se parece al PA, a la DH o a DL IgA con ampollas tensas que pueden o no comprometer las mucosas sin dejar cicatriz ni milia. La respuesta a diferentes terapias es rápida y en pocas semanas se ve la mejoría. Histológicamente se observan ampollas subepidérmicas con infiltrados y micro abscesos papilares de neutrófilos y escasos eosinófilos y mononucleares. La IFD de las biopsias perilesionales muestran depósitos lineares densos de C3 y débiles de IgG en la ZMB. No se han detectado depósitos de IgA o IgM. La IFI en piel humana normal detecta anticuerpos circulantes IgG contra la ZMB y al usar piel separada con sal, los depósitos se localizan exclusivamente en el lado dérmico de la separación, igual que en EAA y LA. El diagnóstico realmente se aclara con el "Immunoblot", el que reconoce, en todos los casos, una banda proteica de 200 kD [106,107].

Inmunopatología en liquen

No siendo el liquen una enfermedad reconocida como autoinmune, se incluye porque existen hallazgos inespecíficos a la IFD que pueden sugerir el diagnóstico de la entidad y porque el liquen plano penfigoide, una forma especial de la enfermedad, si presenta cambios de autoinmunidad. (Tabla 5).

Liquen rubber plano (LRP)

Es una enfermedad de etiología desconocida, subaguda o crónica, caracterizada por lesiones papulares o placas poligonales brillantes eritemato-violaceas que muestran una trama reticular de líneas blanquecinas llamadas estrías de Wickham. En la mayoría de los casos la enfermedad produce un prurito intenso, que puede ser leve o no existir. La histopatología es característica con hiperqueratosis, hipergranulosis focal, acantosis irregular, degeneración de las células basales, infiltrado

denso en banda localizado en dermis superior, muy pegado al epitelio. Los hallazgos en la IFD no son específicos para el LRP, porque se pueden encontrar igualmente en 35 a 50% de biopsias tomadas a personas normales, en las que se observan cuerpos coloides semejantes a los observados en tal enfermedad. Además en otras entidades como el liquen escleroso y en enfermedad injerto versus huésped, también se observan cuerpos coloides en menor número y más dispersos que en LRP. Los cuerpos coloides se encuentran abundantes y agrupados, en un 87% de los casos son de IgM y fibrinógeno y en menor frecuencia se detectan depósitos de IgG, IgA y C3. Además los depósitos de fibrinógeno pueden ser granulares o lineales en la ZMB y fibrilares en la dermis. La IFI es negativa [108,109,110,111].

Liquen plano ampolloso

En algunos pacientes con liquen rojo se pueden observar pequeñas ampollas producidas por la severa degeneración de la basal del epitelio. Los estudios con IFD muestran los mismos cambios que el liquen rojo plano [108].

Liquen plano penfigoide

Es una entidad distinta en la que un paciente con lesiones iniciales de liquen rojo presenta luego múltiples lesiones de ampollas tensas. La histopatología muestra cambios que son los del penfigoide ampolloso aún con predominio de eosinófilos en el infiltrado y la ampolla subepidérmica. En la IFD se encuentran los depósitos de IgG y C3 lineales en la ZMB y IFI es positiva con el mismo patrón que el de PA. Por "immuno-blotting" se detecta un antígeno de 200 kD al parecer diferente al de PA230 aunque los estudios más recientes demostraron que en el liquen plano penfigoide los sueros de varios pacientes reconocen únicamente un epitope nuevo de la porción no colagenosa del dominio extracelular (NC16A) del antígeno de 180kD designado como MCW-4 [112,113,114].

Inmunopatología en el lupus eritematoso

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune del tejido conectivo, inflamatoria crónica, de etiología desconocida que puede afectar solo la piel o múltiples órganos a la vez. Sus manifestaciones clínicas son extremadamente variables y los enfermos pueden sufrir remisiones o recaídas de intensidad y duración variable, las que pueden ocasionar aun la muerte. El diagnóstico se debe hacer cumpliendo los criterios propuestos por la Asociación Americana de Reumatología [115]. Burnham fue el primero en aplicar Igs marcadas con fluoresceína a biopsias de lesiones de piel de pacientes con LES, encontrando una banda brillante, bien demarcada, en la unión dermoepidérmica a la que denominó "banda lúpica" [18]. Posteriormente Cormane describe el mismo hallazgo en piel normal de los pacientes con LES, no así en la de los de lupus eritematosos discoides (LED), lo que popularizó su

uso en el diagnóstico diferencial de estas entidades [116]. Si la banda se encuentra en piel normal de un paciente con lesiones discoides, se puede predecir que probablemente es un paciente con LES y lesiones discoides iniciales. La prueba es de gran especificidad y se correlaciona con positividad en los anticuerpos antinucleares (ANA), eritro-sedimentación elevada y complemento hemolítico bajo. Actualmente solo se considera banda lúpica positiva a aquella encontrada en piel sana no expuesta al sol. La banda puede estar dada por una o varias de las Igs pero la sola presencia de complemento no significa que la prueba es positiva. La presencia en piel normal de IgG sola o acompañada de otras Igs y componentes del complemento, se correlaciona con actividad de la enfermedad. La presencia solo de IgM se asocia a enfermedad leve. Si se encuentran juntas IgM con IgG, la actividad es similar a la de los pacientes con IgG. La banda lúpica puede tener varios patrones:

1. Patrón lineal: es continuo puede ser grueso o fino que se confunde con el de PA.
2. Patrón granular: es intermitente o continuo también puede ser fino o grueso.
3. Patrón afelpado: generalmente muy brillante y grueso.

Otros hallazgos a la IFD, por fuera de la banda lúpica, que pueden orientar en el diagnóstico como son ANA que se observan a veces en el epitelio, y depósitos de Igs en los vasos dérmicos cuando hay vasculitis lúpica. Los cuerpos coloides aunque muy comunes no son específicos [117]. Existen otras ayudas diagnósticas para las diferentes clases de lupus, como son las técnicas de los ANA en células Hep-2 o ELISA para la búsqueda de ANA pero estas últimas resultaron de menor sensibilidad diagnóstica que la IF [118,119,120]. Los principales autoanticuerpos encontrados en lupus sistémico son los anti-dcADN (ácido desoxi-ribonucleico de doble cadena o nativo), anti-histonas, anti-Sm y anti-nucleosoma. Actualmente existen tres métodos para detectar los anticuerpos anti dcADN son la inmunofluorescencia en *Critidia luciliae*, por radioinmunoanálisis de Farr o por ELISA para anti dcADN, siendo la técnica de ELISA de gran precisión. Los anticuerpos anti-histonas que son de gran ayuda en la detección de lupus inducido por drogas, se detectan por medio de técnicas de IF un poco más complejas; en la actualidad se usa la del inmunoanálisis de ELISA [121]. Las técnicas de inmunodifusión fueron las pioneras en la detección de los antígenos nucleares extractables (ANE) pudiéndose determinar también por "immunoblot" o ELISA [122,123,124]. Los anticuerpos anti-nucleosomas o anti-cromatina reconocen un epitope conformado de la combinación de dc-ADN e histona; estos anticuerpos se encuentran tanto en LES activo como inactivo y los títulos altos se asocian a compromiso renal. Los anticuerpos anticromatina tienen una sensibilidad diagnóstica del 70% al 80 % en LES siendo mayor que la de los anticuerpos anti dc-ADN (40% - 60%). Las

técnicas de ELISA para detección de anti-cromatina ya están siendo desarrolladas en laboratorios de diagnóstico muy especializados [125,126].

Agradecimientos. Este trabajo fue auspiciado en parte por "Public Health Service grants" R01-AR32599 (L.A.D.), R37-AR30281 (L.A.D.).

Bibliografía

1. Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Pro. Soc. Biol. Med. (NY)*. 1941;47:200.
2. Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., Berliner, E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol* 1942; 45:159.
3. Riggs, J.L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J., Downs, C.M., Metcalf, T.G. Isotiocyanate compounds as fluorescent labeling agent for immune serum. *Am. J. Pathol* 1958; 34:1081.
4. Felton, L.C., McMillion, C.R. Chromatographically pure fluorescein and tetramethylrhodamine isothiocyanates. *Anal. Biochem* 1961; 2: 178.
5. Oi, V.J., Glaser, A.N., Stryer, L. Fluorescent phycoobiliprotein conjugates for analysis of cells and molecules. *J. Cell. Biol* 1982; 93:981.
6. Plem, J.S. The use of a vertical illuminator with interchangeable dichotic mirrors for fluorescent microscopy with incident light. *Z. Wiss Mikr* 1967; 68:129.
7. Kawamura, A.-Jr., Aoyama, Y. Immunofluorescence in medical Science. University of Tokyo Press, Tokyo.1982; pp: 75-91.
8. Nakane, P.K., Pierce G.B. Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem* 1966; 14:929.
9. Avrameas, S. Coupling of enzymes to proteins with glutar-aldehyde: Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 1969; 6:43.
10. Roth, J., Bendayan, M., Orci, L. Ultra structural localization of intracellular antigen by the use of protein A-gold complex. *J Histochem. Cytochem* 1978; 26:1074.
11. Holgate, C., S., Jackson, P., Cowen, P. N. et al. Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J. Histochem. Cytochem* 1983; 31:938.
12. Talmage, D. W., Baker, H.R., Akeson, W. The separation and analysis of labeled antibodies. *J. Infect. Dis* 1954; 94:199.
13. Kumon, H. Morphologically recognizable markers for scanning immunoelectron microscopy II: An indirect method using T and TMV. *Virology* 1976; 74:93.
14. Sternberg, L. A., Hardy P. H.Jr., Cuculis, J.J., Meyer, H.G. The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish-peroxidase- antihorseadish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem* 1970; 18: 315.
15. Hsu, S-M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidine-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem* 1981; 29: 577.
16. Beutner, E.H., Jordon, R.E. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by direct immunofluorescent staining. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1964; 117:505.
17. Jordon, R.E., Beutner, E.H., Witebski, E. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 1967; 100:751.
18. Burnham, T.K., Neblett, T.R., Fine, G. The application of the fluorescent antibody technique to the investigation of lupus eritematosus and various dermatoses. *J. Invest. Dermatol* 1963; 41:451.
19. Van Weemen, B.K., Shurs, A.H.W.M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 1971; 15:232-236.
20. Engval, E., Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8:871-879.
21. Engval, E., Permann. Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1978; 109:129-135.
22. Kohler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495.
23. Glover, D.M. Gene Cloning. The Mechanics of DNA Manipulation. Chapman and Hall. 1984.
24. Liebman JM, La Sala D, Wong W, Steed PM. When less is more: enhanced baculovirus production of recombinant proteins at very low multiplicities of infection. *Biotechniques* 1999; 26:36-42.
25. Ding X, Aoki V, Mascaro JM Jr, Lopez-Swiderski A, Diaz LA, Fairley JA. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 592-6.
26. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, et al. Characterization of auto antibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997; 159:2010-7.
27. Nishikawa T. Desmoglein ELISAs. *Arch Dermatol* 1999; 135:195-6.
28. 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.
29. Beutner E.H, Kumar V, Krasny S.A, Chorzelski, T.P. Defined Immunofluorescence In Immunodermatology. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. *Immunopathology of the skin*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1987;pp 3-40.
30. Gammon WR, Kowalewski C, Chorzelski TP, et al. Direct immunofluorescence studies of sodium chloride-separated skin in the differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J. Am Acad Dermatol* 1990; 22: 664.
31. Amagi M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, et al. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmogleins 1 and 3 for sero diagnosis of Pemphigus. *Br. J Dermatol* 1999; 140:351-7.

32. Hata Y, Fujii Y, Tsunoda K, Amagai M. Production of the entire extracellular domain of Bp 180 (type XVII collagen) by baculovirus expression. *J Dermatol Sci* 2000; 23:183-90.
33. Lever WF. Pemphigus. *Medicine* 1953; 32:1-123.
34. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; 306:1189-96.
35. Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, et al. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol* 1985; 85: 538-41.
36. Diaz LA, Giudice GJ. End of century overview of skin blisters. *Arch Dermatol* 2000; 136:106-12.
37. Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadheins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 1999; 20:92-102.
38. Ding X, Diaz LA, Fairley JA, Giudice GJ, Lui Z. The Anti Desmolein 1 Auto antibodies in Pemphigus Vulgaris sera are Pathogenic. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 739-43.
39. Masayuki A, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 167-70.
40. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001; 144: 775-80.
41. Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences infrequency and the association with a more severe phenotype. *Br J Dermatol* 2000; 143: 343-8.
42. Miyagawa S, Amagai M, Iida T, Yamamoto Y, Nishikawa T, Shirai T. Late development of antidesmoglein 1 antibodies in pemphigus vulgaris: correlation with disease progression. *Br J Dermatol* 1999; 141:1084-7.
43. Komai A, Amagai M, Ishii K, Nishikawa T, Chorzelski T, Matsuo I, Hashimoto T. The clinical transition between pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris correlates well with the changes in autoantibody profile assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Dermatol* 2001; 144:1177-82.
44. Santi CG, Maruta CW, Aoki V, Sotto MN, Rivitti EA, Diaz LA. Pemphigus herpetiformis is a rare clinical expression of non-endemic pemphigus foliaceus, fogo selvagem, and pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:40-6.
45. Karpati S, Amagai M, Lui WL, Dmochowski M, Hashimoto T, Horvath A. Identification of desmoglein 1 as autoantigen in a patient with intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis type of IgA pemphigus. *Exp Dermatol* 2000; 9:224-8.
46. Kim SC, Kwon YD, Lee IJ, Chang SN, Lee TG. CDNA cloning of the 210-kD paraneoplastic pemphigus antigen reveals that envoplakin is a component of the antigen complex. *J Invest Dermatol* 1997; 109:365-9.
47. Proby C, Fuji Y, Owaribe K, Nishikawa T, Amagai M. Human autoantibodies against HD1/plectin in paraneoplastic pemphigus. *J Invest Dermatol* 1999; 112:153-6.
48. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:803-22.
49. Becker BA, Gaspari AA. Pemphigus vulgaris and vegetans. *Dermatol. Clin* 1993; 11:429-52.
50. Dugan EM, Anhalt G, Diaz LA. Pemphigus. In: Jordan RE, editor. *Immunologic disease of the skin*. Norwalk (CT): Appleton & Lange; 1991; p.279-91.
51. Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Blach MM. The use of two substrates to improve the sensitivity of indirect immunofluorescence in diagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 2000; 142: 1135-9.
52. Nishifui K, Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T. Detection of antigen-specific B cell in patients with pemphigus vulgaris by enzyme linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for auto antibody production. *J Invest Dermatol* 2000; 114:88-94.
53. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, Amagai M. Dominant auto immune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol* 2001; 167:5439-48.
54. Crosby DL, Diaz LA. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). In: Crosby DL, Diaz LA (G. Eds): *Dermatol. Clin: Bulloous diseases*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1993; 11:453-72.
55. Gomi H, Kawada A, Amagai M, Matsuo I. Pemphigus erythematosus: detection of anti-desmoglein 1 antibodies by ELISA. *Dermatology* 1999; 199:188-9.
56. Warren SJP, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, et al. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic Pemphigus foliaceus in Brazil. *N. Engl. J Med* 2000; 343:23-30.
57. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:244-52.
58. Jablonska S, Chorzelski T, Beutner E, Chorzelska J. Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. *Int J Dermatol* 1975; 14:353-9.
59. Ishii K, Amagai M, Komai A, Ebihara T, Chorzelski TP, Jablonska S, Ohya K, Nishikawa T, Hashimoto T. Desmoglein 1 and Desmoglein 3 are the Target Autoantigens in Herpetiform Pemphigus. *Arch Dermatol* 1999; 135:943-7.
60. Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS. The new pemphigus variants: *J. Am Acad Dermato* 1999; 40:649-71.
61. Wallach D. Intraepidermal IgA pustulosis. *J. Am Acad Dermatol* 1992; 27:993-1000.
62. Snedon IB, Wilkinson DS. Subcorneal pustular dermatosis. *Br J Dermatol* 1979; 100: 61-8.
63. Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, Amagai M. Detection of IgA autoantibodies to desmogleins by an enzyme-linked immunosorbent assay: the presence of new minor subtypes of IgA pemphigus. *Arch Dermatol* 2001; 137:735-8.
64. Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, et al. Paraneoplastic pemphigus an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323:1729.
65. Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus. *Adv Dermatol* 1997; 12:77-97.
66. Horn TD, Anhalt GJ. Histologic features of paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol* 1992; 128:1091-5.
67. Shaepi H, Bauer JW, Hamether R, Metze D, Ortiz-Urda S, Salmhofer W, Rappersberger K, Hintner H. A localized variant of paraneoplastic pemphigus: acantholysis associated with malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2001 144:1249-54.
68. Beutner EH, Pelton S, Hashimoto T, Xu Y, Plunkett RW, Korman NJ, Heim TN, Jablonska S. A nonfatal case and 2 fatal cases of paraneoplastic pemphigus: Can a complement indirect immunofluorescent test help to identify fatal "group A" paraneoplastic pemphigus cases? *J Am Acad Dermatol* 2002; 47:841-51.
69. Kiyokawa C, Ruhrberg C, Nie Z, Karashima T, Mori O, Nishikawa T, et al. Envoplakin and periplakin are components of the paraneoplastic pemphigus antigen complex (letter). *J Invest Dermatol* 1998; 111:1236-8.
70. Borradori L, Trueb RM, Jaunin F, Limat A, Favre B, Saurat J.H. Autoantibodies from a patient with paraneoplastic pemphigus bind periplakin, a novel member of the plakin family (Letter). *J Invest Dermatol* 1998; 111:338-40.

71. Mahoney MG Aho S, Stanley JR. The members of the plakin family of proteins recognized by paraneoplastic pemphigus antibodies include periplakin. *J Invest Dermatol* 1998; 111:308-13.
72. Ohyama M, Amagai M, Hashimoto T, Nousari H, Anhalt GJ, Nishikawa T. Clinical phenotype and anti-desmoglein autoantibody profile in paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 593-8.
73. Pisani M, Ruocco V. Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol* 1986; 4:118-32.
74. Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ. Drug-induced pemphigus. *Dermatol Clin* 1993; 11:463-71.
75. Korman NJ, Eyre RW, Zone J, Stanley JR. Drug-induced pemphigus: autoantibodies directed against the pemphigus antigen complex are present in penicillamine and captopril induced pemphigus. *J Invest Dermatol* 1991; 96:273-6.
76. Yokel BK, Hood AF, Anhalt GJ. Induction of acantholysis in organ explants culture by penicillamine and captopril. *Arch Dermatol* 1989; 125:1367-70.
77. Korman NJ. Bullous pemphigoid. In: Crosby DL, Diaz LA (G Eds): *Dermatol Clin: Bullous diseases*. W. B. Saunders Co. Philadelphia 1993; 11:527-33.
78. Lui Z, Guiddice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL Fairley JA, et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997; 100:1256-63.
79. Lui 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.
80. Labib RS, Anhalt GJ, Patel, et al. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 1986; 136:1231-5.
81. Diaz LA, Ratrie H, Sauders WS, et al. Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180 KD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. *J Clin Invest* 1990; 86:1088-94.
82. Giudice GJ, Emery DE, Zelickson BD, et al. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous autoantibodies ectodomain. *J Immunol* 1993; 151:5742-50.
83. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, et al. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti- BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997; 109:679-83.
84. Hata Y, Fujii Y, Tsunoda K, Amagai M. Production of the entire extracellular domain of BP 180 (type XVII collagen) by baculovirus expression. *J Dermatol Sci* 2000; 23:183-90.
85. Shornick JK. Herpes gestationis. In: Crosby DL, Diaz LA (G. Eds): *Dermatol. Clin: Bullous diseases*. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1993; 11:527-33.
86. Morrison LH. Labib RS, Zone JJ, Et al. Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-KD human epidermal antigen. *J Clin Invest* 1988; 81:2023-26.
87. Mutasim DF, Pelc J, Anhalt GA. Cicatricial pemphigoid. In: *Dermatol. Clin* 1993; 11:499-510.
88. Bean SF. Cicatricial pemphigoid. In: Beutner E.H., Chorzelski T. P., Kumar (Eds): *Immunopathology of the Skin*. Wiley Medical Press. New York pp 1987; 355-60.
89. Kirtschig G, Marinkovich P, Burgeson RE, Yancey KB. Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alfa-subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol* 1995; 105:543-48.
90. Ueki H, Yaoita H. Epidermolysis bullosa acquisita. In: *A Colour Atlas of Dermato-Immunohistocytology*. Wolfe Medical Publication Ltd. London pp. 1989; pp 72-73.
91. Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus eritematosus: Diseases of autoimmunity to type VII collagen. In: Crosby DL, Diaz LA (G. Eds): *Dermatol. Clin: Bullous diseases*. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1993; 11:535-547.
92. Gammon WR, Wilson BD, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. *Immunopathology of the skin*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons 1987; pp 383-98.
93. Ghohestani RF, Nicolas JF, Rouselle P, Claudy AL. Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of sub epidermal autoimmune bullous dermatoses. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1102-7.
94. Feliciani C, Di Muzio M, Mohammad Pour S, Allegretti T, Amerio P, Toto P, Coscione G, Proietto G, Amerio P. Suction split as a routine method to differentiate epidermolysis bullosa acquisita from bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 10:243-7.
95. Fine JD, Hintner H, Katz SI. Immunofluorescence studies in Epidermolysis bullosa utilizing polyclonal and monoclonal antibodies. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. *Immunopathology of the skin*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons 1987; pp 399-405.
96. Karpati S, Stoltz W, Meurer M Braun-Falco O, Krieg T. In situ localization of IgG in epidermolysis bullosa acquisita by immunogold technique. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:280.
97. Briggaman RA, Gammon WR. Epidermolysis bullosa acquisita and other acquired blister diseases manifesting autoimmunity type VII collagen. *Curr Prob Dermatol* 1991; 3:47-74.
98. Gammon WR. Herman Pincus Memorial Lecture 1992. Autoimmunity to collagen VII: Autoantibody mediated pathomechanisms regulate clinical-pathological phenotypes of acquired epidermolysis bullosa and bullous SLE. *J Cutan Pathol* 1993; 20:109-14.
99. Chan LS, Lapierre J Ch, Chen M, Traczynski T, Mancini AJ, Paller AS, Woodley DT, Marinkovich MP. Bullous systemic lupus erythematosus with autoantibodies recognizing multiple skin basement membrane components, bullous pemphigoid antigen 1, laminin-5, laminin-6, and type VII collagen. *Arch Dermatol* 1999; 135:569-573.
100. Leonard JN, Haffenden GP, Fry L. Dermatitis herpetiformis. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. *Immunopathology of the skin*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons 1987; pp 433-453.
101. Smith EP, Zone JJ. Dermatitis Herpetiformis and linear IgA bullous dermatosis. In: Crosby DL, Diaz LA (G. Eds): *Dermatol. Clin: Bullous diseases*. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1993; 11: 511-526.
102. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Rajadhyaksha M, Jablonska S. Tissue transglutaminase and endomysian antibodies-diagnostic markers of gluten-sensitive enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol* 2001; 98: 378-82.
103. Dahale AV, Aldhous MC, Humphreys K, Ghosh S. Serum IgA tissue transglutaminase antibodies in celiac disease and other gastrointestinal diseases. *QJM* 2001; 94:195-205.
104. Kanitakis J, Mauduit G, Cozzani E, et al. Linear IgA bullous dermatosis of childhood with autoantibodies to a 230 kD epidermal antigen. *Pediatric Dermatol* 1994; 11:139-44.
105. Zillikens D, Herzele K, Georgi M Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM JR, Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Brocker EB, Giudice GJ. Autoantibodies in a subgroup of patients with

- linear IgA disease react with the NC16A domain of BP 180. *J Invest Dermatol* 1999; 113:947-53.
106. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, et al. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 1996; 106:1333-8.
107. Mascaro JM, Zillikens D, Giudice GJ, et al. A subepidermal bullous eruption associated with IgG autoantibodies to a 200 kDa dermal antigen: The first case report from the United States. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:309-15.
108. Bergfeld WF, Valenzuela R, Beutner EH. Lichen planus. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. *Immunopathology of the skin*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1987. pp 647-58.
109. Weigand DA, Ziegler TR. Lichen planus. In: Jordon RE, editor. *Immunologic disease of the skin*. Norwalk (CT): Appleton & Lange; 1991. pp. 623-9.
110. Faiile-Kuyper EH, Faiile H. An immunopathology: the diagnostic use of direct and indirect immunofluorescence techniques in dermatologic disease. *Hum Pathol* 1979; 90:365-71.
111. Abell E, Presbury DGC, Marks R, Rannarain D. The diagnostic significance of immunoglobulin and fibrin deposition in lichen planus. *Br J Dermatol* 1975; 93: 17-24.
112. Davis AL, Bhogal BS, Whitehead P, et al. Lichen planus pemphigoides: Its relationship to bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 1991; 125: 263.
113. Whitehead P, Bhogal BS, Das AK, et al. Lichen planus pemphigoides: A clinicopathological study of nine cases. *Histopathology* 1991; 19: 147.
114. Zillikens D, Caux F, Mascaro JM, Wesselmann U, Schmidt E, Prost C, Callen JP, Brocker EB, Diaz LA, Giudice GJ. Autoantibodies in lichen planus pemphigoides react with a novel epitope within the C-terminal NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 117-21.
115. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
116. Cormane RH. "Bound" globulin in the skin of patients with chronic discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1964; 1:534.
117. Dahl MV, Gilliam JN. Direct Immunofluorescence in Lupus Erythematosus. In: Beutner E.H, Chorzelski T.P., Kumar (Eds): *Immunopathology of the Skin*. Wiley Medical Press. New York 1987; pp 499-516.
118. Burnham TK, Bank PW. Antinuclear antibodies: I. Patterns of nuclear immunofluorescence. *J Invest Dermatol* 1974; 62:526-34.
119. Burnham TK. Antinuclear antibodies: II. The prognostic significance of nuclear immunofluorescent patterns in lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1975; 111:203-7.
120. Ulvestad E. Performance characteristics and clinical utility of a hybrid ELISA for detection of ANA. *APMIS* 2001; 109:217-22.
121. Linnemann M, Geisen C, Menn S, Dinsler R, Herzberg C, Wielckens K. Comparison of three different ds-DNA ELISA with special regard to their efficiency in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. In: Conrad K, Humber R-L, Meurer M, Shoenfeld Y, Tan EM (ed). *Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity*. Lengerich: PABST Science Publishers; 2000.
122. Kumar V, Beutner EH, Dabski K et al. A standardized method of detecting antibodies to extractable nuclear antigens (RNP and Sm) by gel precipitation. *J Clin Lab Immunol* 1984; 15:163-66.
123. Struckmann J, Manthorpe R, Bendixen G.: Anti-ENA antibodies in serum determined by ELISA-e-technique. Description of method and recommended procedure. *Allergy* 1981; 36:397-403.
124. Yasuma M, Takasaki Y, Matsumoto K, Kodama A, Hashimoto H, Hirose S. Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with Lupus Erythematosus. *J Reumatol* 1990; 17: 469-75.
125. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Caucoub P, Amoura I, Musset L, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases. Antinucleosome antibodies of the IgG subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:76-84.
126. Koutouzov S, Bach JF, Jerónimo A, Campos H, Peitte JC, Amoura Z.: The antinucleosome antibodies. Clinical significance and role in the diagnosis of autoimmune diseases. In: Conrad K, Humber R-L, Meurer M, Shoenfeld Y, Tan EM (ed). *Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity*. Lengerich: PABST Science Publishers; 2000.

Anexo 1. Cuestionario de autoevaluación

1. ¿Qué clase de microscopio se usa para la lectura de las pruebas de inmunofluorescencia directas e indirectas?
- Microscopio de rastreo.
 - Microscopio de campo oscuro.
 - Microscopio de luz ultravioleta.
 - Microscopio electrónico.
 - Microscopio de luz directa.
2. ¿Cuál de las siguientes pruebas usa espectrofotómetros con densitometría de reflexión para su lectura?
- Inmunoprecipitación.
 - Inmunofluorescencia.
 - "immunoblotting".
 - Ensayo inmunoenzimático (ELISA).
 - Inmunodifusión.
3. ¿En cuál de los siguientes se pueden expresar las proteínas recombinantes?
- Virus (Baculovirus).
 - Bacterias
 - Células COS-7
 - Todas las anteriores
 - Ninguna de las anteriores.
4. ¿Cuál de los siguientes cambios histológicos es característico de los pénfigos?
- Paraqueratosis.
 - Acantosis.
 - Acantolisis.
 - Apoptosis.
 - Hiperqueratosis.

5. ¿Cuál de las desmogleinas no es antígeno de los pénfigos ?
 a.Desmogleina 1.
 b.Desmogleina 2.
 c.Desmogleina 3.
 d.Todas las anteriores.
 e.Ninguna de las anteriores.
6. ¿Qué antígenos se detectan en pacientes con pénfigo vulgar mucocutaneo?
 a.Desmocolinas 1 y 2.
 b.Desmogleina 1 y 3.
 c.Desmogleina 1 y 2.
 d.Desmogleina 2 y 3.
 e.Todas las Desmogleinas.
7. ¿Cuál de las Caderinas es el antígeno del pénfigo foliáceo?
 a.Desmogleina 1.
 b.Desmogleina 2.
 c.Desmogleina 3.
 d.Desmocolina 1.
 e.Desmocolina 2.
8. ¿A cuál de las formas de pénfigo pertenecen la dermatosis pustular subcórnea (DPS) de Sneddon y Wilkinson y la dermatosis neutrofílica intra epidérmica (DNI).?
 a.Pénfigo paraneoplásico.
 b.Pénfigo vulgar.
 c.Pénfigo foliáceo.
 d.Pénfigo herpetiforme.
 e.Pénfigo IgA.
9. ¿Cuál de los pénfigos presenta antígenos múltiples dirigidos tanto a caderinas como a plaquinas?
 a.Pénfigo paraneoplásico.
 b.Pénfigo vulgar.
 c.Pénfigo foliáceo.
 d.Pénfigo herpetiforme.
 e.Pénfigo IgA.
10. ¿A qué nivel se produce la ampolla en los penfigoides?
 a.Subcórnea.
 b.Intra-epidérmica.
 c.Sub-epidérmica por encima de la lámina densa.
 d.Sub-epidérmica por debajo de la lámina densa.
 e.Ninguna de las anteriores.
11. ¿Cuál de los siguientes proteínas es común para todos los penfigoides ?
 a.Proteína de 230 kD.
 b.Proteína de 180 kD.
 c.Proteína de 290 kD.
 d.Proteína de 200 kD.
 e.Laminina 5 (epilagrina).
12. ¿La epidermolisis ampollosa adquirida y el lupus ampolloso comparten autoanticuerpos predominantemente IgG contra uno de los siguientes antígenos?
 a.Antígenos nucleares (ANA).
 b.Colágeno XVII.
 c.Antígenos nucleares extractables.
 d.Colágeno VII.
 e.ADN nativo.
13. ¿Para cuál de las siguientes entidades no se usa como ayuda diagnóstica la inmunofluorescencia indirecta con piel separada con sal?
 a.Penfigo ampolloso.
 b.Eruzión ampollosa subepidérmica asociada a anticuerpos IgG contra antígeno subepidérmico de 200 KD..
 c.Epidermolisis ampollosa adquirida.
 d.Lupus ampolloso.
 e.Lupus sistémico.
14. ¿Cuál de las siguientes enfermedades autoinmunes ampollosas presenta anticuerpos contra el colágeno XVII?
 a.Todos los penfigoides.
 b.Dermatosis linear IgA.
 c.Liquen plano penfigoide.
 d.Todas las anteriores
 e.Ninguna de las anteriores.
15. La dermatitis herpetiforme y la dermatosis linear IgA presentan autoanticuerpos IgA subepidérmicos contra diferentes antígenos; ¿Cuál afirmación es verdadera?
 a.Ambas entidades se asocian a enteropatía al gluten.
 b.Ambas entidades responden bien a la terapia con Diamino Difenil Sulfona (DDS).
 c.Ambas entidades tienen auto anticuerpos anti-endomisium.
 d.Ambas entidades tienen auto anticuerpos contra la transgutamina-tisular (anti-tTG).
 e.Ambas entidades reaccionan contra el colágeno tipo XVII ó antígeno BP180.
16. ¿Para cuál de estas entidades los títulos de la inmunofluorescencia indirecta son de valor pronóstico y sirven de control en la terapia?
 a.Pénfigos
 b.Penfigoides
 c.Dermatitis herpetiforme
 d.Todas las anteriores
 e.Ninguna de las anteriores
17. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones no comparte el liquen plano penfigoides con el liquen rojo plano y el liquen plano ampolloso?
 a.Entidad de origen desconocido.
 b.Evolución sub-aguda ó crónica.
 c.Las placas eritemato-violáceas presentan estrías de Wickham.
 d.La histopatología presenta hiperqueratosis con hipergranulosis focal, acantosis irregular, degeneración de células basales e infiltrado denso en banda sub-epidérmica en las lesiones liquenoides.
 e.La inmunofluorescencia indirecta es negativa.
18. ¿Cuál de los siguientes hace el diagnóstico de lupus eritemato-sistémico?
 a.Tener anticuerpos antinucleares positivos.
 b.Tener una banda lúpica positiva en piel expuesta al sol.
 c.Detección de anticuerpos anti histonas.
 d.Cumplir los criterios de la Asociación Americana de Reumatología
 e.Inmunofluorescencia positiva en Crisalia luciliae.
19. ¿Cuál de los siguientes inmunoreactantes en la banda lúpica se correlaciona con actividad de la enfermedad?
 a.IgM.
 b.IgG.
 c.IgE.
 d.IgA.
 e.Complemento.
20. ¿Cuál de los siguientes anticuerpos nos hacen sospechar lupus inducido por drogas?
 a.ANA.
 b.ANE
 c.Anti-ADN
 d.Anti-histonas.
 e.Anti-cromatina.

di; 13. e; 14. d; 15. b; 16. a; 17. e; 18. d; 19. b; 20. d.
 1.c; 2.d, 3.d; 4. c; 5. b; 6.b; 7. a; 8.e; 9. a; 10. c; 11. b; 12.

Respuestas: