

103
31.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

INMUNOFLUORESCENCIA
TESINA

QUE PRESENTA :

GONZALEZ TRUJILLO GIL ALBERTO

PARA OBTENER EL TITULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

Directora de Tesina

CDMO. BEATRIZ C. ALDAPE BARRIOS



FACULTAD DE
ODONTOLOGIA

México, D.F. 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
FUNDAMENTOS DE INMUNOFLUORESCENCIA	2
II.1. Fluorocromos	3
II.2. Patrones de Inmunofluorescencia.....	4
III.- GENERALIDADES INMUNOHISTOQUIMICAS	6
III.1. Anticuerpos Antinucleares	6
III.2. Detección de Antígenos en Células y Tejidos	7
III.3 Detección de ANA por inmunofluorescencia.....	8
IV.- TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA	9
IV.1. Inmunofluorescencia Directa	10
a) Técnica	10
IV.2. Inmunofluorescencia Indirecta.....	12
a) Técnica	13
V.-MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA	15
V.1 Microscopio de Luz Incidente	16
V.2. Microscopio de Luz de Transmisión	16
VI.- RECOLECCION Y MANEJO DE ESPECIMENES	17
VI.1 - Estuches de Recolección Disponibles	17
VI.2. Recolección y Manejo de Especímenes	17
VI.3. Procesamiento de Especímenes	19
VII.- ENFERMEDADES DE LA PIEL Y MUCOSA	19
VII.1. Enfermedades Vesiculo-ampulosas	19
VII.2 Enfermedades de Tejidos Conectivos	21
VII.3. Vasculitis	29
VII.4 Linfomas cutáneos	30

CONCLUSIONES	32
GLOSARIO	34
BIBLIOGRAFIA	37

ANEXO

Fig. 1	7
Fig. 2	8
Fig. 3	12
Fig. 4	15
Fig. 5	19
Fig. 6	22
Fig. 7	25
Fig. 8	28
Fig. 9	28
Fig. 10	30

INTRODUCCION

La inmunofluorescencia fue introducida principalmente hace casi 30 años por Coons. La técnica implica el estudio de antígenos en secciones tisulares por el uso de anticuerpos específicos que pueden ser marcados con color y es aplicado sobre secciones de tejido para que se forme una microprecipitación en el sitio del antígeno.⁽¹⁰⁾

La tintura fluorescente usada más acostumbrada es fluoresceína e isoniácida uniendo anticuerpos al suero y produce una sustancia fluorescente cuando es iluminado con luz ultravioleta.⁽¹⁰⁾

La sencilla aplicación de la técnica es usando un simple tratamiento con un anticuerpo marcado y posteriormente lavar con una solución fisiológica salina para detectar anticuerpos cuando menos de 10 mg de suero están presentes.⁽¹⁰⁾

Los anticuerpos son proteínas gamaglobulinas sintetizadas por el sistema inmunológico de un animal cuando se expone este animal a una sustancia extraña (antígeno) por ejemplo la inyección de un virus de un animal a una persona puede producir una respuesta en el sistema inmunológico que actualmente desemboca en la producción de una o más proteínas.⁽¹⁰⁾

FUNDAMENTOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las técnicas de inmunofluorescencia son introducidas por Coons en 1941, desde entonces se han utilizado profusamente tanto para el diagnóstico clínico como para investigaciones básicas.⁽⁶⁾

Coons (1941) desarrollo la obtención de un anticuerpo específico dirigido sobre una sustancia determinada, esta es la mejor forma de localizar en una sección histológica dicha sustancia, por desgracia, los anticuerpos por si solos no son visibles en el microscopio, pero Coons y su grupo tuvieron una ingeniosa idea de "marcar" los anticuerpos con otro colorante, el isotiocianato de fluorescencia, que aunque por si sola no es visible, al ser excitada por la luz ultravioleta (onda electromagnética cuya longitud de onda no estimula la retina humana y son por tanto visibles), emite una luz verde amarillenta que es claramente visible.⁽²⁾

Esta técnica simple y elegante abrió un campo completamente nuevo en histoquímica, buena prueba de su utilidad, es que en los últimos 30 años, se ha convertido en una técnica imprescindible tanto para el virologo como para el bioquímico; para el investigador puro como para el mismo patólogo que diagnóstica alguna enfermedad renal. (1).

La fluorescencia es una forma de luminiscencia que se extiende, está última como la emisión de luz que se produce a partir de una fuente de energía no térmica.⁽⁶⁾

La fluorescencia primaria o autofluorescencia es aquella que presente determinadas sustancias de forma espontánea, sin necesidad de ser modificadas; por ejemplo, la lámina elástica de las arterias muestran autofluorescencia en determinadas condiciones.⁽⁹⁾

En los tejidos que no poseen esta propiedad se puede inducir fluorescencia-fluorescencia secundaria mediante tinción histoquímica con moléculas fluorescentes denominados fluorocromos uniendo fluorocromos a anticuerpos dirigidos contra antígenos tisulares; de este último procedimiento se sirven las técnicas de inmunofluorescencia.⁽⁶⁾

II.1. FLUOROCROMOS

Los fluorocromos son sustancias químicas que tienen la capacidad de absorber fotones de alta energía, procedentes de la radiación ultravioleta o del cuerpo visible, ello provoca una redistribución de los electrones de las moléculas fluorescentes, puesta de manifiesto de una radiación luminosa de longitud de onda distinta aunque de espectro visible. ⁽⁶⁾

Los fluorocromos son sustancias, que cuando se someten a una fuente luminosa emiten una luz de longitud de onda superior (350 nm) a la que excitó (490 nm). ⁽⁷⁾

Los fluorocromos más utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia son la fluoresceína, la rodamina y la ficoeritrina. La fluoresceína se usa generalmente en forma de isotiocianato (FITC), absorbe luz azul y emite fluorescencia verde manzana. La rodamina se emplea en forma de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), absorbe luz verde y emite fluorescencia rojo-anaranjada. Por último la ficoeritrina (pce) absorbe luz azul y produce fluorescencia roja. ⁽⁸⁾

Los colorantes fluorescentes, como el isotiocianato de fluorescencia (FITC) y la rodamina, pueden unirse químicamente (conjugarse) con anticuerpos sin destruir su especificidad. Este anticuerpo marcado fluorescente se emplea para distribuir descubrir reacciones específicas de antígeno-anticuerpo y pueden usarse para localizar antígenos y anticuerpos de especificidad conocida en cortes de tejidos. ⁽⁹⁾

Cuando los tejidos marcados en esta forma se iluminan con luz ultravioleta en un microscopio ultravioleta, es posible identificar los componentes tisulares específicos marcados por su brillante fluorescencia verde manzana contra un fondo oscuro o contraefido. ⁽⁸⁾

Esta técnica se utiliza para ver varias estructuras tisulares y depósitos anormales de anticuerpo, otras macromoléculas bacterias y virus en tejidos infectados y frotis. ⁽⁹⁾

Un fluorocromo se considera óptimo para las técnicas de inmunofluorescencia si reúne las siguientes condiciones: ⁽⁹⁾

a) Mínima interferencia en la relación antígeno - anticuerpo.

- b) **Máxima estabilidad para las condiciones de almacenamiento.**
- c) **Disponibilidad sencilla en su forma purificada**
- d) **Máximo de emisión comprendido dentro del espectro de luz visible**
- e) **La longitud de onda de luz excitadora de la fluorescencia y de la luz emitida por el fluorocromo deben estar lo suficientemente distantes como para que puedan diferenciarse fácilmente.**
- f) **El fluorocromo debe descomponerse lo menos posible con la exposición de la luz**

II.2. PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Los sueros que contienen ANA producen una fluorescencia de color verde manzana en los núcleos celulares. Conviene recordar aquí que en las células eucarióticas (es decir, de organismos multicelulares), el núcleo representa el compartimento donde se forma el ARN y comienza la síntesis de proteínas e histonas (que son proteínas de carga positiva. Pues bien, la observación microscópica de las estructuras nucleares que presenta fluorescencias hacen posible discernir el patrón según el cual se distribuye el Ag-Ac, lo que permite una aproximación con fines diagnósticos. ⁽¹⁾

Los cuatro patrones de fluorescencia nuclear descubiertos con esta técnica son originados por diferencias en a distribución de antígenos en los núcleos celulares se describen en forma característica como sigue: ⁽²⁾

1.- Patrón Homogéneo:

Se ve todo el núcleo de la célula fluorescente por igual y se debe a los anticuerpos contra desoxirribonucleoproteínas e histonas. Los cromosomas aparecen como masas fluorescentes de formas irregulares con los bordes externos más fluorescentes es el momento más inespecífico. ⁽¹⁾

Característico en especial de lupus eritematoso sistémico (LES) pero también se observa en la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren y la esclerodermia. ⁽²⁾

2.- Patrón Periférico

Se ve el contorno del núcleo más fluorescente, mientras que el centro aparece una fluorescencia uniforme pero de menos intensidad. ⁽¹⁾

Es una distribución periférica de la fluorescencia, producido por anticuerpos anti -DNA y por lo general solo se ve en el LES, en especial con nefritis activa. ⁽⁸⁾

3.- Patrón moteado:

Aparecen puntos fluorescentes intranucleares más frecuentes en el centro, el núcleo muy definido y generalmente sin fluorescencia en los nucleolos. El patrón moteado fino a veces es indistinguible del homogéneo ENA son muy específicos de diversas enfermedades como se verá. ⁽¹⁾

Tinción particular discreta del núcleo, producido por un anticuerpo contra una glucoproteína nuclear; es más común en artritis reumatoide, enfermedades hepáticas, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren y esclerodermia; también ocurren reacciones inespecíficas de este tipo de individuos normales de edad avanzada. ⁽⁸⁾

4.- Patrón nucleolar:

Solo se tiñen los nucleolos de las células (se ven menos de 8 puntos fluorescentes relativamente grandes por célula); los cromosomas aparecen negativos. Este patrón indica la presencia de anticuerpos contra el ARN nucleolar. Es poco frecuente en el LES, y se asocia a esclerodermia y fenómeno de RAYNAUD. ⁽¹⁾

III.- GENERALIDADES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Los métodos inmunohistoquímicos sirven para detectar antígenos celulares o tisulares mediante reacciones antígeno - anticuerpo.

Para visualizar el lugar donde ocurre la reacción antígeno - anticuerpo es preciso emplear un trazador marcado. El marcaje puede realizarse con fluorocromos (técnicas de inmuno-oro) o isótopos radiactivos. ⁽⁶⁾

El antígeno puede detectarse tanto por marcaje directo del anticuerpo (técnicas directas) como por alguno de los muchos métodos del marcaje secundario. ⁽⁶⁾

III.1. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Los anticuerpos antinucleares ocupan un lugar preponderante por su frecuencia y su valor diagnóstico (por lo menos en lo que se refiere a los anticuerpos anti -DNA.) Los primeros anticuerpos descritos son los antinucleoproteínas, detectados por el fenómeno LE que se estudia en primer lugar debido a su importancia histórica y a su interés diagnóstico en el medio no especializado. ⁽²⁾

El fenómeno de las células LE ; es una reacción "in vitro" que sucede cuando se rompen leucocitos artificialmente (por ejemplo : sangre anticoagulada con bolitas de vidrio) dejando fragmentos de sus núcleos expuestos a los sueros que contengan anticuerpos antinucleoproteínas (las nucleoproteínas son proteínas unidas al DNA, en los cromosomas); la cromatina sufre entonces una alteración que hace que los restantes leucocitos viables la fagociten (en presencia del complemento), adquiriendo los granulocitos una forma específica que se reconocen en la tinción de Wright. Esta técnica ha sido superada como se verá. ⁽¹⁾

Los ANA aparecen en el suero de los pacientes con lupus eritematoso, diseminado (LES), esclerodermia y EMTC con títulos, a veces muy elevados. Con títulos bajos se pueden encontrar en cualquier otra conectivopatía y en pacientes de edad avanzada. ⁽¹⁾

III.2.- DETECCIÓN DE ANTIGENOS EN CELULAS Y TEJIDOS

Dado los colorantes fluorescentes tales como la fluoresceína y la rodamina se acoplan a los anticuerpos sin destruir su especificidad, pueden combinarse los conjugados con antígeno presente en un corte de tejido y visualizarse a través del microscopio de luz fluorescente. De este modo se demuestra la distribución del anticuerpo en el tejido y dentro de las células. Dese otro punto de vista también puede utilizarse el método para detectar anticuerpos dirigidos contra antígenos que se sabe están presentes en un corte determinado en tejido o preparado celular. ⁽¹²⁾ Fig. 1.



Fig.1.- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos fluorescentes son reactivos histoquímicos específicos que pueden reaccionar con antígenos específicos también, para identificarlos. ⁽⁴⁾

Es un procedimiento que ha demostrado ser de gran utilidad para la detección y localización de antígenos. ⁽⁴⁾

Los anticuerpos específicos son conjugados compuestos fluorescentes, resultando de ello un material sensitivo con reactividad inmunológica que no se altera. El antígeno conjugado es agregado alas células o tejidos y queda fijado a los antígenos formando un complejo estable, fluorescente. ⁽⁴⁾ Fig. 2.

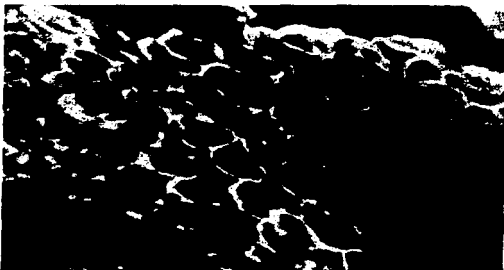


Fig.2.- FIJACION DE ANTIGENOS EMITE FLUORESCENCIA

Entre las aplicaciones de utilidad clínica se encuentra la identificación de: ⁽⁴⁾

- a) Microorganismos en tejidos y cultivos
- b) Componentes de C en los tejidos
- c) Autoanticuerpos en el suero
- d) Ac Específicos fijos en los tejidos
- e) Células T y B en la sangre
- f) Cromosomas específicos
- g) Ag Específicos en tumores o tejidos neoplásicos
- h) Hormonas y Enzimas
- y) Ac antinúcleo, Ac antimitocondria, Ac antimembrana, Ac anti DNA

III.3. DETENCION DE ANA POR INMUNOFLUORESCENCIA

Los anticuerpos antinucleares ocupan un lugar preponderante por su frecuencia y valor diagnóstico (por lo menos en lo que se refiere a los anticuerpos Anti DNA). Los primeros anticuerpos descritos son los antinucleoproteínas, detectado por el fenómeno LE que estudia en primer lugar debido a su importancia histórica y a su interés diagnóstico en el medio no especializado. ⁽⁵⁾

El fenómeno de las células LE. Este fenómeno se describió por primera vez en la médula ósea de pacientes con SLE. Refleja la presencia de anticuerpo IgG contra desoxirribonucleoproteínas. ⁽¹⁴⁾

La inmunofluorescencia actualmente es la técnica más empleada para el estudio de los anticuerpos antinucleares. El sustrato puede ser en un corte de hígado o de riñón de rata o en un frotis de leucocitos de ser humano. La fijación de los ANA sobre los núcleos se revelan bajo la luz ultravioleta por la aplicación de un suero anti-inmunoglobulina marcado con un conjugado fluorescente. ⁽²⁾

La determinación de ANA en ocasiones es positiva en individuos normales, en pacientes con diversas enfermedades crónicas y en los ancianos. Sin embargo, los títulos altos con frecuencia están relacionados con SLE. La ausencia de ANA es una evidencia fuerte contra el diagnóstico de SLE. ⁽¹⁴⁾

IV.- TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las técnicas de inmunofluorescencia se realizan casi siempre sobre tejido congelado porque el procedimiento de fijación es sobre formol e inclusión en parafina presenta varios inconvenientes para el desarrollo de estos métodos. Entre estos inconvenientes figuran el aumento de los fenómenos de autofluorescencia y el bloqueo de gran cantidad de determinados antígenos provocado por los agentes fijadores. ⁽⁶⁾

El método de inmunofluorescencia permite localizar el antígeno o anticuerpo sobre la superficie de células vivas en suspensión o en el citoplasma o en los núcleos de las células en secciones congeladas de tejido. ⁽³⁾

La inmunofluorescencia brinda alternativa a los ensayos de inmunoadsorción como un medio para detectar y localizar antígenos al establecer el diagnóstico de las enfermedades bacterianas, micóticas, parasitarias y virales. Con esta técnica, el anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, resultando en un rastreado sensible con la reactividad inmunológica inalterada. ⁽⁷⁾

En la inmunofluorescencia se utilizan comúnmente dos procedimientos de "coloración": Directo e Indirecto. En el procedimiento Directo o de una etapa la fluoresceína o rodamina se une a la fracción de IgG aislada de un antisuero que contiene anticuerpos dirigidos contra un componente específico de células o tejido. Por otra parte, el fluor puede

unirse al antígeno para localizar al anticuerpo específico sintetizado en células o secciones de tejido. ⁽³⁾

Algunas de las aplicaciones más comunes para la inmunofluorescencia son la detección directa de *Bordetella Pertusi*, *Chlamydia Trachomatis*, especies de *Legionella*, virus herpes tipo 1 y 2, virus sincicial respiratoria y varias otras especies bacterianas de importancia médica. También se usa para detectar anticuerpos en el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis, la sífilis y el citomegalovirus. ⁽⁷⁾

El proceso continuo en el desarrollo de fluorocromos mejorados, conjugado y técnicas microscópicas más modernas, ha aumentado la sensibilidad y la especificidad de la inmunofluorescencia, lo que brinda a los laboratorios la posibilidad de detectar los agentes causales de las enfermedades infecciosas. ⁽⁷⁾

IV.1.- INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

En la técnica de inmunofluorescencia Directa se utiliza un anticuerpo específico frente al antígeno que se desea detectar, conjugado a un anticuerpo. ⁽⁶⁾

En esta técnica, el antisuero conjugado se añade directo a la sección de tejido o suspensión de células viables. ⁽¹⁴⁾ El método directo es simple y rápido de realizar son pocas reacciones inespecíficas; sin embargo es menos sensible. ⁽⁷⁾

PROCEDIMIENTO TÉCNICO:

- 1.- Se realizan cortes de criostato de aproximadamente 5 micras de espesor.
- 2.- Se delimita, mediante un círculo realizado con un lápiz de diamante alrededor de cada sección, la superficie de incubación con los anticuerpos (puede utilizarse para portaobjetos diseñados específicamente para metodología inmunohistoquímica).
- 3.- Fijar acetona fría a 20°C, ENTRE 5 Y 15 MINUTOS.
- 4.- Secar los cortes al aire
- 5.- Realizar 3 lavados en PBS de 10 minutos cada uno.
- 6.- Drenar el exceso de PBS y secar alrededor del círculo usando un pañuelo de papel.
- 7.- Cubrir la sección con el antisuero primario conjugado, a la dilución óptima determinada previamente. La incubación se realizará en cámara húmeda preservada de la luz a temperatura ambiente y durante 30 minutos.

- 8.- Realizar otros 3 lavados como en el paso 5 y secar igualmente en torno al círculo.
- 9.- Montar utilizando un medio hidrosoluble específico para inmunofluorescencia, o en su defecto en PBS-glicerol gelatina, sellar los bordes del cubreobjetos con esmalte de uñas o usar en su lugar polivinilalcohol.
- 10.- Almacenar a 4 C hasta su lectura en un microscopio de fluorescencia preservando en todo momento de la luz.

RESULTADOS

-- Marcaje con EITC	Fluorescencia verde-manzana
-- Marcaje con TRITC	Fluorescencia rojo-anaranjado

OBSERVACIONES

La técnica directa de inmunofluorescencia se usa fundamentalmente en el diagnóstico de patología y se determinan las lesiones cutáneas. ⁽⁶⁾

El anticuerpo contra el sustrato del tejido, se conjuga con el fluorocromo y se aplica directamente. Por ejemplo si se desea demostrar la distribución tisular de un autoantígeno gástrico que reacciona con los autoanticuerpos presentes en el suero de una paciente con anemia perniciosa. Se aísla IgG del suero del paciente se conjuga con fluoresceína y se aplica en una sección de mucosa gástrica humana ubicada sobre un portaobjeto. Al observarse con el microscopio de fluorescencia se observa que el citoplasma de las células parietales esta brillantemente coloreado.

Si se emplea antisuero conjugado con los colorante que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda pueden indentificarse simultáneamente do antígenos diferentes en el mismo preparado. ⁽¹²⁾ Fig 3



Fig.3. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

IV.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Esta técnica permite la detección de anticuerpo en el suero. Elimina la necesidad de purificar y conjugar individualmente cada muestra de suero. El método es, básicamente una adaptación de la reacción de antiglobulina (prueba de Coombs), o técnica del anticuerpo doble. Se deberá revisar la especificidad según se describe y establecer más aún métodos de bloqueo y neutralización. ⁽¹⁴⁾

Se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado y en una segunda fase, un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo, que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario. ⁽⁶⁾

Se han utilizado diversas variaciones adicionales en las técnicas de tinción. Estas comprenden un suero conjugado anticomplementario para la detección de complejos inmunitarios que contengan complemento o tinción doble con rodamina, con conjugados de rodamina y fluoresceína. ⁽¹⁴⁾

Se ha aplicado ampliamente la inmunofluorescencia que emplea procedimientos serológicos de rutina, para la detección de anticuerpos en especímenes séricos humanos.

La sensibilidad es, en general mayor con la fijación del complemento, y menor que con la inhibición de la hemaglutinación. ⁽¹⁴⁾

El método indirecto es más sensible y da una fluorescencia más brillante no obstante es menos específico, sujeto a la reactividad cruzada creciente. ⁽⁷⁾

El uso de métodos enzimáticos es ventajoso para los laboratorios que realizan gran volumen de exámenes diarios para un solo determinante (por ejemplo: Clamydia Trachomatis). Aunque las técnicas fluorescentes son considerablemente más trabajosas, la posibilidad de observar los elementos celulares de fondo para determinar la propiedad del espécimen constituye una clara ventaja. Debido a que los microorganismos del C. Trachomatis están localizados dentro de las células epiteliales columnares, la presencia de células epiteliales escamosas y una preponderancia de segmentados, eritrocitos o cantidad excesiva de mucus indican un espécimen inadecuado. ⁽⁷⁾

TECNICA INDIRECTA

Este método se emplea sobre todo para detectar anticuerpos en el suero de pacientes con enfermedad autoinmune. Puede ser muy útil fabricar un bloque que contenga distintos tejidos porque ello permite detectar diferentes autoanticuerpos de forma simultánea y con una única muestra de suero.

A continuación se indican los tejidos recomendados para determinar los tipos más usuales de autoanticuerpos:

- Anticuerpos antinucleares ANA (hígado y riñón de rata).
- Anticuerpos antimúsculo liso SMA (riñón y estómago de rata)
- Anticuerpos antimitocondriales AMA (riñón y estómago de rata)
- Anticuerpos antimicrosomiales frente a hígado y de riñón (hígado y riñón de rata)
- Anticuerpos antimicrosomas tiroideo (tejido tiroideo humano)
- Anticuerpos antimúsculo estriado (esófago de rata)
- Anticuerpos antineutrófilos ANCA (granulocitos humanos).

PROCEDIMIENTO TECNICO**MODO DE OPERAR:**

1. Diluir en PBS el suero que se desee probar. Para la mayor parte de autoanticuerpos puede emplearse una dilución a 1/10. Para detectar anticuerpos frente a los islotes de Langerhans y glándula adrenal se debe emplear el suero sin diluir.
 2. Incubar las secciones de tejido elegidas con el suero problema, durante 30 minutos a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C.
 3. Realizar 3 lavados en PBS de 10 minutos cada uno.
 4. Drenar el exceso de PBS.
 5. Incubar con el conjugado de inmunoglobulina anti-Ig humana y fluorocromo a la dilución óptima durante 30 minutos en cámara húmeda preservada de la luz. Puede usarse un antisuero polivalente frente a todas las inmunoglobulinas.
 6. Decantar el antisuero y realizar 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
 7. Montar en medio hidrosoluble específico para inmunofluorescencia.
- Marquee con FITC Fluorescencia verde-manzana
- Marquee con TRITC Fluorescencia rojo-anaranjada

OBSERVACIONES:

Los sueros que resulten positivos pueden titularse haciendo diluciones seriadas del suero problema e indicando la dilución más alta a la que la técnica resulta positiva. Por ejemplo, se señala que unos anticuerpos antimicrosomiales son positivos con un título de 1/1600, quiere decirse que ésta es la dilución más alta a la que la inmunotinción resulta positiva. ⁽⁹⁾ Fig.4.

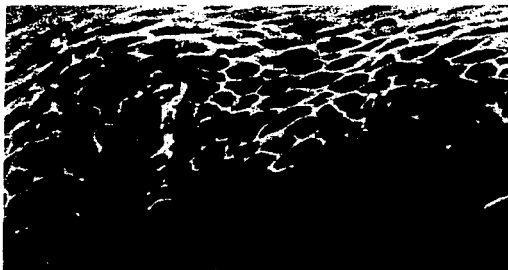


Fig 4. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

V.- MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Con el advenimiento del microscopio electrónico, sus aumentos y resoluciones, los conocimientos de biología celular dieron un salto gigantesco; los distintos comportamientos celulares dejaron de ser elucubraciones en algunos para convertirse en una realidad palpable e innegable. ⁽¹¹⁾

Microscopio para las lecturas. existen equipos especiales, no obstante pueden utilizarse un microscopio común que posea condensador de fondo oscuro y lámpara de luz ultravioleta para la iluminación. Esta debe contar con filtros excitadores que dejen pasar solamente luz ultravioleta y el microscopio debe tener un filtro de bloqueo que impida la llegada del exceso de luz al ojo del observador. ⁽¹²⁾

Se expondrán brevemente los componentes básico de un microscopio de fluorescencia:

1. Fuente luminosa: proporciona la energía luminosa. Las más empleadas son las lámparas de arco de mercurio y las halógenas.

2. **Filtro primario o de excitación:** restringe el paso de la luz a las longitudes de onda necesarias para estimular la fluorescencia.
3. **Condensador:** para dirigir y enfocar las longitudes de onda emitidas por la muestra.
4. **Filtro secundario o de barrera:** para bloquear la luz no deseada y dejar pasar sólo la fluorescente.
5. **Oculares:** para aumentar y visualizar la muestra fluorescente. ⁽¹⁾

V.1 MICROSCOPIO DE LUZ INCIDENTE

Los microscopios utilizados para visualizar los especímenes inmunofluorescentes son modificaciones de los microscopios estándar. En 1967 Ploem introdujo un sistema de epifluorescencia que emplea un iluminador vertical y un espejo dicróico, este sistema de haz de excitación se enfoca directo sobre espécimen del tejido a través del objetivo de la lente, la luz fluorescente emitida del espécimen epiiluminado, se transmite, entonces al ojo a través del espejo dicróico. Un espejo dicróico permite el paso de luz de longitudes de ondas seleccionada en una dirección a través de él, pero no en la dirección opuesta. ⁽¹⁴⁾

V.2 MICROSCOPIO DE LUZ DE TRANSMISION

Hay varias ventajas distintas al sistema Ploem. La fluorescencia se puede combinar con luz transmitida para el examen de contraste de fase de los tejidos, permitiendo así una mejor definición de la morfología y fluorescencia. También, un sistema intercambiable de filtros permite un examen rápido del espécimen a diferentes longitudes de onda para un tinción doble de fluorocromos, es decir, rojo y verde (rodamina y fluoresceína, respectivamente). ⁽¹⁴⁾

Esta ventaja en la técnica ha dado como resultado una sensibilidad superior para el examen de la membrana celular fluorescente en linfocitos vivos. ⁽¹⁴⁾

VI.- RECOLECCION Y MANEJO DE ESPECIMENES**VI.1 ESTUCHES DE RECOLECCION DISPONIBLES****Estuches para Estudios Inmunofluorescentes (IF)**

Este estuche es apropiado para enfermedades vesiculoampulosas, Vasculitis, lupus eritematoso y otras de las listadas en la siguiente sección. Incluye 4 tubos de pruebas y una solicitud.⁽¹⁵⁾

Para estudios inmunofluorescentes Directos :

Un tubo rojo para un espécimen de biopsia de tejido afectado, marcado "DIRECTO IF (Lesional Biopsy)".

Ambos tubos contienen el medio de Michel para transportarse, lo que les permite transportarse a temperatura ambiente y se ha encontrado que es comparable a biopsias congeladas frescas para inmunoreactivos y marcadores de superficie de célula T. Este medio de transporte es estable a temperatura ambiente por cuando menos un año.⁽¹⁵⁾

Para Estudios Inmunofluorescente

Un tubo rojo marcado "DIRECT IF (Lesional Biopsy)" que contiene medio para transporte.

Para Estudios de Suero

Un tubo vacío anaranjado marcado "SERUM".⁽¹⁵⁾

VI.2 RECOLECCION Y MANEJO DE ESPECIMENES

Los especímenes requerido s y los estudios de laboratorio indicados *varía con los diagnósticos clínicos.*⁽¹⁵⁾

Especímenes de biopsia para estudios inmunofluorescentes:

Los especímenes de biopsia de cuando menos 3-4 mm. o más grandes de diámetro deben de ser colocados inmediatamente en el tubo rojo marcado "DIRECTO IF (Lesional

Biopsy)" o en el tubo azul marcado "DIRECT IF (Normal Biopsy)" y enviados a temperatura ambiente.

Para estudios de células B, los especímenes deben de se congelados rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de haber sido extirpados. Se requieren biopsias congeladas.⁽¹⁵⁾

INFORMACION QUE NECESITA PARA LOS ESTUDIOS DE BIOPSIA

Para proveer al clínico con una interpretación apropiada de los descubrimientos inmunofluorescentes e histológicos, debe proveerse la siguiente información en la solicitud.

- EDAD
- SEXO
- SOSPECHA DE DIAGNOSTICO
- LUGAR(ES) DE LA BIOPSIA
- DESCUBRIMIENTOS CLINICOS MAYORES
- TRATAMIENTO
- DESCUBRIMIENTOS MAYORES DE LABORATORIO
- SI SE SOSPECHA SLE, CHEQUENSE LOS CRITERIOS PARA,⁽¹⁵⁾

ENFERMEADES VESICULO-AMPULOSAS

1. Pénfigo
2. Penfigoide
3. Herpes gestacional
4. Gingivitis escamativa
5. Dermatitis linear IgA bulosa
6. epidermolisis bullosa adquirida(EBA)

VASCULITIS

- A) porfiria
- B) liquen plano

LINFOMAS CUTANEOS

A) lupus hantematoso (LE) ⁽¹⁵⁾

VII.-ENFERMEDADES DE PIEL Y MUCOSAS**VII.I.- ENFERMEDADES VESICULO-AMPULOSAS**

Los estudios inmunofluorescentes e histológicos ofrecen diagnósticos y a veces descubrimientos pronostico en la enfermedades VESICULO-AMPULOSAS. Esto incluye pénfigo, pénfigoide bulloso, pénfigoide cicatrizal y otras formas de pénfigoide, EBA, dermatosis bullosa linear IgA, herpes gestaciones, dermatitis, herpétiforme, estomatitis ulcerativa crónica y otras erupciones menos comunes. Las combinaciones de estudios inmunofluorescentes e histológicos para sospecha de porfina, liquen plano entema multiforme, lesiones psonasiformes y dermatitis alérgica de contacto también pueden dar información útil. ⁽¹⁵⁾ Fig 5.



Fig.5. PRESENTACION CLINICA.

DESCUBRIMIENTOS INMUNOFLORESCENTES
EN ENFERMEDADES VESICULO-BULOSAS

ENFERMEDAD	BIOPSIA IF DIRECTA	SUERO IF INDIRECTO	RELEVANCIA
pénfigo todas las formas	depósitos de IC de IgG.-90%de incidencia	anticuerpos IC->90%	diagnóstico IIF o DIF
penfigoide bullosa y otras formas de penfigoide	1 IgC y/o C. también otras Ig en BMZ; linear-90%	anticuerpos IgC clase BMZ-70% de incidencia	diagnóstico DIF y/o IIF
penfigoide cicatrizal y variantes Brunsting-perry	1 IgC y/o C. también otras Ig en BMZ;linear-90%	anticuerpos IgG clase BMZ-10% de incidencia	diagnóstico DIF y/o IIF
a epidemolisis Bullosa Acquicista (EBA)	Ig y/o en BMZ;linear casi 100%	anticuerpos IgC clase BMZ-25% de incidencia	diagnóstico DIF y/o IIF
herpes gestacional	C3-100%, Ig -30-50% en BMZ linear	factor HG-50% anticuerpos IgG clase BMZ-20% de incidencia	diagnóstico DIF y/o IIF
dermatitis bullosa linear IgA	IgA 100% tambien F, raramente C en BMZ linear	anticuerpos IgA clase BMZ -10 de incidencia	diagnóstico DIF
dermatitis herpétiforme	IgA F y C en papilas dermales, granular o fibrilar, >90% de incidencia	IgA clase EMA en -70% AGA en 8%, ARA en -25%	DIF y/o IIF o ELISA, diagnóstico
liquen plano y otras erupciones liquenoides	IgM y otros Ig en cuerpos citoides, fibrina en y debajo de junturas dermales/epidemoides	ninguno especifico	DIF altamente sugestivo
estomatitis ulcerativa	Igc en el núcleo de	epitelio estratificado	DIF altamente

crónica	epidermis y epitelio oral, más fuerte en capa basal y como en líquen plano	ANA específico	sugestivo
---------	--	----------------	-----------

VII.2.- ENFERMEDADES DE TEJIDO CONECTIVO

PENFIGO

Los anticuerpos epiteliales intercelulares identificados por IF indirecto son diagnosticados para pénfigo. Estos anticuerpos ocurren en más del 90% del suero de pénfigo activo los anticuerpos de pénfigo vulgaris y sus variantes se pueden distinguir de aquellos de pénfigo focales y sus variantes en un 80% a 90% de los casos probando en dos sustratos del tejido. Además el uso de dos sustratos mejora mejor la detección de estos anticuerpos. Los verdaderos anticuerpos pénfigo también se diferencian de anticuerpos parecidos a los pénfigos y a los anticuerpos del grupo sanguíneo lo que puede llevar a resultados positivos falsos. ⁽¹⁵⁾

SIGNIFICANCIA DE PRONOSTICO DE ANTICUERPOS PENFIGOS

Los cambios en la dosificación de anticuerpos de pénfigos son de importancia pronóstica. Una separación o descuento significativo de la dosificación de anticuerpos de pénfigo, frecuentemente indica que la enfermedad se está retirando y puede permitir una reducción en la dosis de corticosteroides u otros agente terapéuticos. ⁽¹⁵⁾

Similarmenete, durante la remisión, en la dosificación a menudo procede una exacerbación y puede ser una indicación para aumentar la dosis de la medicina. Así, las pruebas periódicas de suero para detectar cambios en las dosificaciones ayudan a evaluar la evolución de la enfermedad. Se recomienda que el suero sea probado cada 2-3 semanas hasta la remisión y cada 1-5 meses después de esta. ⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS INMUNOFLUORESCENTES EN BIOPSIAS DE PIEL Y MUCOSAS

En pacientes de penfigo, la piel normal y las mucosas en la orilla o cerca de lesiones, tienen depositos intercelulares IgG, particularmente en áreas lesionadas de casos sin tratar. Estas ocurren en esencial en todos los casos verdaderos de penfigo (el verdadero penfigo incluye p.vulgaris, p. foliaceo, p. eritematoso, p. vegetans, p. herpétiforme, IgA, p. paraneoplásico.) Sin embargo, descubrimientos negativos pueden llegar a ocurrir en áreas lesionadas debido a cambios secundarios y piel normal perilesionada en casos inactivos. ⁽¹⁵⁾

Las varias formas de penfigo pueden ser confiablemente distinguidas unas de las otras por sus descubrimientos clínicos y por estudios de suero. Fig.6

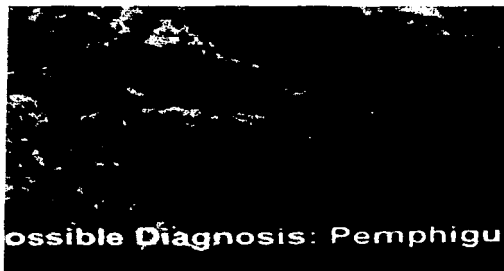


Fig.6. DIAGNOSTICO DE PENFIGO.

PENFIGO VULGAR

Se pueden ver generalmente depósitos IgG intercelulares en la capa espinosa de la célula y/o lapidados con IgG en la superficie de las células epiteliales. ⁽¹⁵⁾

PENFIGO FOLIACEO

Los depósitos intercelulares de IgG tienden a restringirse a las porciones superiores de la capa espinosa de la célula aunque esto no permite un criterio confiable para la determinación con penfigo vulgares⁽¹⁵⁾

PENFIGO IgA

Se puede ver tipo vulgares y foliaceo y se manifiesta IgA intercelular en las biopsias. Todavía existe algo de controversia sobre la terminología de esta condición.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS HISTOLOGICOS**PENFIGO VULGAR:**

Se observan formación de ampollas intraepiteliales con rupturas suprabasales y células acantolíticas.⁽¹⁵⁾

PENFIGO VEGETANS:

La formación pseudoepiteliomatosa hiperplasia y absceso intraepiteliales con eosinofis son característicos. Pueden estar presentes o no en células acantolíticas⁽¹⁵⁾

PENFIGO FOLIACEO:

Las ampollas con acantolisis se forman dentro o inmediatamente debajo del estrato granuloso.⁽¹⁵⁾

PENFIGO ERITEMATOSO:

Ligeros cambios microscópicos son idénticos a penfigo foliaceo.

PENFIGO PARANEOPLASICO :

Los desordenenes paraneoplasicos comprenden complejos de sintomas que resultan de los efectos de tumores remotos no metastasicos. Los sindromes paraneoplasicos están asociados a varios tipos de neoplasmas y pueden afectar varios órganos tales como la piel, ojos, musculos y cerebro. Ocasionalmente las señales y síntomas del síndrome paraneoplásico puede ser la primera indicación de un neoplasma oculto.⁽¹⁵⁾

El penfigo paraneoplásico puede limitar al eritema multiforme, líquen plano bulloso y al penfigo cicatricial y necesita ser diferenciado. Los tipos de neoplasia asociados con penfigo paraneoplásico incluyen linfoma, leucemia linfocítica crónica, timoma, o un sarcoma probablemente diferenciado.⁽¹⁵⁾

DIAGNOSTICO DE PENFIGO PARANEOPLASICO

- 1.- Erupciones mucocutáneas con ampollas y/o erosiones
- 2.- Dermatitis epidermal y acantosis
- 3.- deposición de la membrana intercelular y basal de IgG y C3 en biopsias por inmunofluorescencia directa
- 4.- anticuerpos de suero reactivos con componentes intercelulares de epitelio transicional y columnar simple
- 5.- Inmunoprecipitación de anticuerpos de suero a 250, 230, 210 y 190 kD antígenos.⁽¹⁵⁾

HISTOLOGIA

Las características mayores de la histología de la paraneoplasia penfigoide incluyen acantosis epidermal, separación suprabasal, queratinosis disqueratósica, vacuolización basal y exostosis epidermal de células inflamatorias

El diagnóstico del penfigo paraneoplásico no se puede hacer con confianza solo los exámenes histológicos, especialmente en ausencia de acantosis. un diagnóstico exacto depende de los estudios de inmunofluorescencia a directa e indirecto.⁽¹⁵⁾

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Los estudios de inmunofluorescencia directa en piel lesionada revelan depósitos intercelulares de IgG con o sin complementos en un patrón de entintado que emita al penfigo. Además, pueden haber depósitos complementarios en zonas de membrana base. primariamente granular pero a veces con un patrón lineal. Ya que varios pacientes tienen penfigo paraneoplásico tienen una involucración conguntival, el obtener biopsias conguntivas pueden ser primordial para establecer un diagnóstico de penfigo paraneoplásico, especialmente con estudios no diagnósticos de biopsias de piel y mucosas.⁽¹⁵⁾

PENFIGOIDE BULOSO Y CICATRIZAL, HERPES GESTACIONAL, (PENFIGOIDE GESTACIONAL), ESTOMATITIS ULCERATIVA CRONICA Y EPIDERMOLISIS BULOSA ADQUIRIDA.

Para el diagnostico de penfigoide buloso (PB) y su diferenciación de la epidermolisis bulosa adquirida (EBA) se indican los estudios inmunofluorescentes de tanto los especímenes de suero como de biopsia. Para el diagnostico de penfigoide cicatriza y herpes gestacional, los estudios de biopsia son usualmente diagnósticos, y los estudios de suero son de valor limitado.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTO DE INMUNOFLUORESCENCIA EN BIOPSIAS DE PIEL Y MUCOSAS

Los estudios de inmunofluorescencia de biopsias en especímenes de piel o mucosa oral pueden servir para establecer un diagnostico de penfigoide o EBA. En ambas enfermedades, la piel normal en las orillas de las ampollas tienen depósitos característicos en la zona de membrana base de IgG y/o complementos y a veces IgA, IgM y fibrina. Los descubrimientos de IF Directo de la zona de la membrana base tienen una significancia prolongada en penfigoide buloso. Los descubrimientos de biopsias en depósitos complementarios lineares en piel normal de la muñeca, con o sin depósitos de IgG se asocian generalmente a la enfermedad activa.⁽¹⁵⁾ Fig.7.

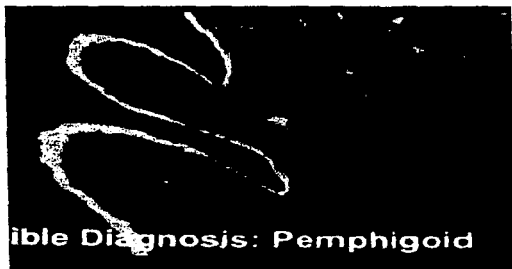


Fig.7. DIAGNOSTICO DE PENFIGOIDE.

HERPES GESTACIONAL (HG) O PENFIGOIDE GESTACIONAL

Una variante del penfigoide el cual generalmente aparecen en el último trimestre del embarazo y/o periodo postparto, puede ser identificado por estudios de inmunofluorescencia directa de biopsias de piel. Ya que los estudios de suero de pruebas rutinarias de inmunofluorescencia generalmente no revelan el factor HG del herpes gestacional, los estudios de inmunofluorescencia directa en las biopsias característicamente revelan componente C3 complementarios y a veces IgG en la zona de la membrana base.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS HISTOLOGICOS

Todas las formas de penfigoides se caracterizan por ampollas subepidermal. Las biopsias se deben de tomar de lesiones tempranas ya que las ampollas más antiguas puede que muestren regeneración con la aparición de una ampolla intra-epidermal. La epidermis forma el techo de la ampolla en lesiones tempranas pero puede volverse necrótica, particularmente en lesiones más antiguas. Las ampollas contienen leucocitos y eosinofilos polimorfonucleares. El tejido conectivo de abajo muestra un tejido infiltrado perivascular mononuclear con un numero variado de neutrofilos y eosinofilos. A menudo los neutrofilos ocurren en un arreglo lineal a lo largo de la zona de unión. Histologicamente, la diferenciación del eritema multiforme puede ser difícil. La inmunofluorescencia en tales casos permite los medios más confiables de diferenciación.⁽¹⁵⁾

EBA

El penfigoide se puede distinguir de las lesiones de EBA por medio de dos pruebas inmunofluorescentes en especímenes de biopsia de piel normal que tengan depósitos lineares IgG en la zona de la membrana de base. En el penfigoide bulloso el IgG aparece ya sea en el techo epidermal de la separación de ambos lugares el piso dermal. En el EBA el IgG aparece únicamente en el piso. La otra prueba que también se puede usar para distinguir el BP del EBA es el mapeo IF esta prueba da resultados interpretables únicamente si los estudios de IF directos muestran depósitos de zonas de membranas de base y que el espécimen es Lesional e incluye una ampolla fresca con separación sub-epidermal.⁽¹⁵⁾

DERMATITIS LINEAR IgA BULLOSA

La dermatitis linear IgA bullosa ocurre más frecuente en niños que en adultos. Ambos, los estudios de suero y de biopsias que se indican para el diagnóstico de LABD. Estos estudios también ayudan a diferenciar de otras enfermedades vésiculo bullosas.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS INMUNOFLUORESCENTES EN BIOPSIAS DE PIEL Y MUCOSAS

Los depósitos lineares de IgA en la zona de membrana base son diagnósticas de LABD. Estos depósitos pueden estar acompañados de depósitos de IgG de intensidad más débil. Estos descubrimientos distinguen al penfigoide bulloso y/o a la dermatitis herpétiforme del LABD a la cual se pueden parecer clínicamente.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS HISTOLOGICOS

Vesículas subepidérmicas o ampollas caracterizan a LABD. En la mayoría de los casos, están presentes microabscesos del tipo que se encuentra en dermatitis herpétiforme aunque pueden haber descubrimientos del tipo penfigoide.⁽¹⁵⁾

DERMATITIS HERPETIFORME

Los estudios inmunofluorescentes en ambos, piel y suero, se indican para el diagnóstico y para sospechar el grado de involucración de intestinos. Los estudios inmunofluorescentes directos típicos de la presencia de depósitos de IgA en las papilas dermales de la piel son diagnósticas, a la dermatitis herpétiforme (DH) se le asocia con enteropatía sensible al gluten.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS INMUNOFLUORESCENTES EN BIOPSIA DE PIEL

La presencia de depósitos inmunes IgA en las papilas dermales de piel normal es la marca de (DH), los depósitos IgA son detectables en el 80% de los lugares en piel normal cerca de secciones o áreas generalmente involucradas en dermatitis herpétiforme tales como los glúteos. Esto es independiente con el tratamiento de sulfas. Los depósitos granulares de IgA en las papilas dermales son virtualmente diagnósticas de la dermatitis herpétiforme.⁽¹⁵⁾

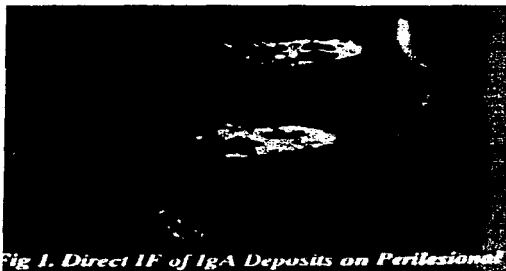


Fig. 8. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

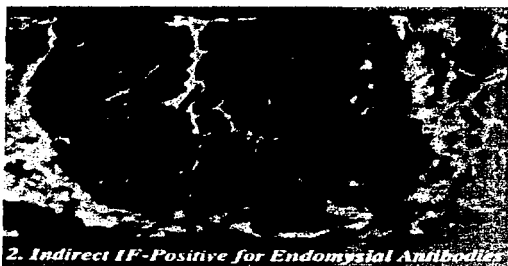


Fig.9. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

DESCUBRIMIENTOS HISTOLOGICOS

ESTO NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las vesículas multiloculares subepidermales adyacentes a aquellas llenas de neutrofilos y ocasionalmente eosinofilos (microabcesos papilares) a parecen en las papilas. Para mejor resultados, las biopsias para histología debería incluir la piel entematosada adyacente a una ampolla.⁽¹⁵⁾

VII.3. VASCULITIS

Si se sospecha de Vasculitis leucocitoclastica, púrpura Henoch-Schönlein u otras Vasculitis, deben obtenerse biopsias de piel normal a 10mm de la lesión, un segundo espécimen de biopsia de una lesión fresca pueden ser valiosa en algunas instancias. Ya que los cambios detectados por la inmunofluorescencia preceden a los cambios detectados por la inmunofluorescencia proceden a los cambios histológicos, los estudios inmunofluorescentes de lesiones anteriores son de valor limitado.⁽¹⁵⁾

LIQUEN PLANO

Los estudios de inmunofluorescencia directa o histológicos de especimenes de biopsias de piel o mucosas ayudan en el diagnostico de erupciones liquenoides. Etiología diversas parecen estar involucradas. No hay marcadores de anticuerpos de suero confiables para liquen plano.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS DE INMUNOFLOURESCENCIA EN BIOPSIAS DE PIEL Y MUCOSAS

En los estudios de inmunofluorescencia directa los cuerpos citoides y/o depósitos de fibrina son significativos hacia el diagnostico de liquen plano. Los cuerpos citoides (o coloides) con IgM y a menudo otros Ig, fibrina, generalmente parecen cerca de las uniones dermal-epidermal (o lamina propia/epitelial) en especimenes de biopsia de piel lesionada o mucosas, particularmente en las áreas de degeneración hidrópica de capa basal.⁽¹⁵⁾ FIG 10

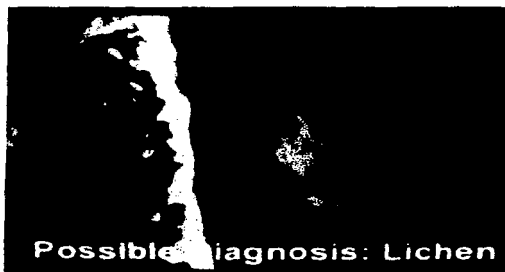


Fig.10.- DIAGNOSTICO DE LIQUEN PLANO.

DESCUBRIMIENTOS HISTOLOGICOS

La hiperqueratosis, hipergranulosis focal, acantosis irregular, degeneración de la capa basal y de una banda de infiltrados predominantemente linfocíticos caracterizan las lesiones de liquen plano. Los infiltrados se extienden hacia abajo de la nebulosa región de unión a una claramente demarcada frontera.⁽¹⁵⁾

ESTOMATITIS ULCERATIVA CRONICA

La estomatitis ulcerativa crónica con anticuerpos antinucleares específicos de epitelios estratificados es una enfermedad oral poco común que dura toda la vida y la cual ocurre en mujeres generalmente de más de 40 años de edad.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS INMUNOFLUORESCENTES EN BIOPSIAS DE PIEL Y MUCOSAS

Los especímenes de biopsia de mucosa/piel perilesionales o preferentemente especímenes separados normales y lesionales, revelan cambios liquenoides en la áreas lesionadas y depósitos nucleares IgG manchados primariamente en los epitelios normales.⁽¹⁵⁾

GINGIVITIS DESCAMATIVA

La gingivitis descamativa crónica es una manifestación clínica de varias enfermedades. Una clasificación basada en consideraciones etiológicas incluye dermatosis, influencias hormonales, respuesta anormal a la imitación, infecciones crónicas y causas idiopáticas. Las pruebas inmunofluorescentes en especímenes de biopsias gingivales normales y perilesionales y de suero son a menudo más reveladores que las examinaciones microscópicas ligeras para identificar la etiología subyacente. Los estudios de suero son principalmente ventajosos en penfigo.⁽¹⁵⁾

ENFERMEDADES ASOCIADAS CON GINGIVITIS DESCAMATIVA

Diagnostico inmunologico	% Estimulado*
penfigoide cicatrizal *	35
penfigo **	3
liquen plano ***	28
negativo (no descubrimientos específicos de enfermedad)	33

condiciones poco usuales ***

- * los descubrimientos inmunofluorescentes son diagnósticos
- ** los diagnósticos inmunofluorescentes son sugestivos pero no diagnósticos⁽¹⁵⁾
- *** incluyen estomatitis ulcerativa crónica, psoriasis y enfermedad oral linear IgA.⁽¹⁵⁾

PORFIRIA

Los estudios de biopsias de piel lesionada dan descubrimientos claramente interpretables en porfiria. También en ciertas otras enfermedades bullosas solo los especímenes de biopsia lesionada, no los estudios de suero para anticuerpos, dan descubrimientos inmunopatológicos interpretables o sugestivos. Ellos incluyen Vasculitis, dermatitis de contacto alérgico, lesiones psoriasisiformes.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS INMUNOFLUORESCENTES EN BIOPSIAS DE PIEL EN PORFIRIA

Las verdaderas porfirias con niveles altos de suero, orina y/o deposiciones o pseudoporfirias inducidas por drogas o químicamente dan patrones de reacción característicamente homogéneos. de IgG y a veces también de IgA y fibrina en el engrosado endotelio de los pequeños vasos de la dermis papilar de la piel lesionada. Muchos especímenes también tienen una banda fibrilar de IgG en la unión dermal-epidermal. Las lesiones más avanzadas desarrollan ampollas subepidermales, los estudios de mapeo inmunofluorescentes de ampollas frescas indican que la separación ocurre en la lamina lucida.⁽¹⁵⁾

DESCUBRIMIENTOS HISTOLÓGICOS EN PORFIRIA

Los depósitos eosinofílicos homogéneos aparecen en los alrededores de los vasos sanguíneos de la dermis papilar y a veces en el plexo medio dermal. Las lesiones más avanzadas desarrollan ampollas subepidermales frecuentemente con papilas dermales que se extienden hasta el piso.⁽¹⁵⁾

CONCLUSIONES

Una vez estudiada la investigación bibliográfica podemos decir el método de inmunofluorescencia ha sido en los últimos 30 años hasta hoy, uno de los métodos de diagnóstico con mucha importancia para el investigador puro.

Actualmente es la técnica más empleada para el estudio de anticuerpos en una innumerable gama de enfermedades, tanto de origen sistémico como enfermedades de piel y mucosas.

La inmunofluorescencia es un método de diagnóstico que nos brinda una alternativa como un medio para detectar y localizar antígenos y así establecer el diagnóstico de enfermedades bacterianas, micóticas, parasitarias y virales. Hay varias técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos pero dadas las características podemos considerar a la inmunofluorescencia como una prueba de laboratorio en la cual no se requieren de aparatos costosos y que no consumen mucho tiempo para su estudio.

Hay técnicas económicamente no muy costosas y además muy fáciles de estudiar pero tienen una gran desventaja que son muy sensibles. Es por eso que esta técnica de inmunofluorescencia está catalogada como uno de los métodos de diagnóstico esencialmente simple y elegante.

IMPORTANCIA ODONTOLÓGICA

Si tomamos en cuenta que la mayoría de las enfermedades tienen manifestaciones bucales y que necesariamente tenemos que estudiarla histológicamente es importante tomar en cuenta a esta técnica de diagnóstico para poder estudiar sus componentes histológicos. Tiene varios usos como por ejemplo cuando tenemos sospechas de pérfigo, gingivitis, escamativa, estomatitis, o alguna lesión que requiere hacer un diagnóstico y así poder tratarla es por eso que la inmunofluorescencia es de mucha utilidad.

GLOSARIO

ACANTOLISIS: Estado particular de las células del cuerpo mucoso de malpighi caracterizado por la disminución de su adherencia reciproca favorece a la formación de ampollas

ANTICUERPO (Ab): Sustancia especifica de la sangre y liquido de animales inmunes producida por una reacción a la introducción de un antígeno y que ejerce una acción antagónica especifica sobre la sustancia cuya influencia se ha formado.

Es el agente de la inmunidad adquirida. Los anticuerpos abarcan los amboceptores, aglutininas, autoenzimas, antitoxinas, bacteriolisinas citotoxinas hemolisinas

ANTIGENO (Ag): Término general que para toda sustancia que introducida al organismo animal provoca la formación de anticuerpos. Son las bacterias vivas o muertas

BULLOSA: Ampollas o bulas.

CITOIDE: Parecido a una célula

DERMATOSIS: Término general para las afecciones de la piel especialmente de la dermis.

ECCEMA: Lesión cutánea caracterizada por placa roja intensa pluriginosa ligeramente prominente a la cual aparecen rápidamente grupos de pequeñas vesiculas transparentes y se desgranar.

EPIDERMOLISIS: Fragilidad de la dermis a las presiones, determinar con gran facilidad la despegadura y abombamientos en forma de ampollas.

ESCLERODERMA: Dermatitis caracterizada por engrosamiento de la piel y tejido celular subcutáneo y a veces por los tejidos profundos

EXOCITOSIS: Presencia en las lesiones epidérmicas de la eccema (espongiosis y vesiculas) de células mononucleadas monocitos e histiocitos procedentes de la dermis se acompañan a la exoserosis.

EXOSEROSIS: Proceso de reacción cutánea observado en la eccema sea cual fuera su naturaleza se caracteriza por la producción de líquido que disocia en primer lugar las células de la epidermis (espongiosis) y después forma vesículas y se derrama al exterior por la ruptura de éstas.

FENOMENO DE RAYNAUD: Hipersensibilidad de las manos y dedos al frío, como resultado de un espasmo de las arterias digitales con blanqueamiento y entumecimiento de los dedos.

FLUORESCENCIA: Emisión de luz monocromática mientras una sustancia está siendo irradiada con luz de color diferente

FLUORESCENCIA: $C_{20}H_{14}O_5$ Polvo amarillento muy soluble en agua empleado como reactivo en oxidasas y peróxido se ha usado para diagnóstico de tiempo de circulación y tópicamente en lesiones oculares y cerebrales para delinear zonas enfermas

FLUORESCENTE: Dotado de fluorescencia

HERPES: Erupción de grupos de vesículas profundas sobre bases eritematosas.

HERPETIFORME: Se asemeja al herpes.

INMUNOGLOBULINA (Ig): Glucoproteína presente en el plasma y otros líquidos orgánicos de la mayoría de los vertebrados que constituye los anticuerpos componentes fundamentales de los mecanismos de inmunidad humoral.

IgA: Clase de inmunoglobulina que predomina en las secreciones

IgD: Clase de inmunoglobulina que predomina en los linfocitos B del hombre

IgE: anticuerpo involucrado en las reacciones de hipersensibilidad inmediata

INMUNOFLUORESCENCIA: Técnica histológica o citoquímica para la determinación y localización de antígenos en los cuales el anticuerpo específico es conjugado con compuestos fluorescentes resultando un trazador sensible que puede detectarse por medición fluorométrica.

INMUNOGENO: Sustancia que al ser introducida en un animal estimula la respuesta inmunitaria, el término inmunogeno puede denotar también una sustancia que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en contraste con alguna sustancia que sólo puede combinarse con anticuerpos, por ejemplo un antígeno.

INMUNOGENICIDAD: Propiedad de una sustancia que se vuelve capaz de inducir una respuesta inmunitaria detectable.

INMUNOPATOLOGIA: Estudio de las reacciones mórbidas provocadas por la aparición de un antígeno en el microorganismo y la formación consecutiva del anticuerpo correspondiente.

ULCERA: Lesión de la superficie de la piel o mucosas ocasionada por pérdida superficial de tejido en general con inflamación.

VACUOLIZACIÓN: Formación de cavidades.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Amich Oliveiras Silvia, Laboratorio de Inmunología. Intemacional Mc Graw Hill. 1984. pags.198 a 205.
- 2) Bach Jean Francois. Inmunología. Limusa 1984. pags 275 a 276 y 721 a 72
- 3) Barajuf Benacerraf. Inmunología. Medica Panamerica. 1986. pags 62 a 65
- 4) Cortez José Luis. Alergia e Inmunología en la Clínica. Clínicas de Alergia. 1979. pags 714 a 716.
- 5) Chapel Helen. Inmunología Clínica. Limusa. 1984. pags 431 a 434.
- 6) García del Moral. Laboratorio de Anatomía Patológica. Interamericana Mc Graw Hill. 1993 pags. 332 a 340.
- 7) Konomall, Allen, Buwell, Sanda. Diagnóstico de Microbiología. Médica Panamericana. pags. 867 a 868.
- 8) Linch Malcolm A. Medicina Bucal
- 9) Margini Ricardo A. Inmunología e inmunoquímica. Medica Panamericana. pags. 528 a 529.
- 10) Neville J Bryant. Laboratory of Immunology and Serology. Saunders Company. pags.
- 11) Martínez Hernandez Antonio, Inmunología. Prensa Científica. 1979. pags. 159 a 164.
- 12) Rolt M. Ivan. Inmunología Fundamentos. Medica Panamericana. 1994. pags 99 a 105
- 13) Stites Daniel P. Inmunología Básica y Clínica. El manual Modemo 1993 pags. 274 a 279 y 513 a 519.
- 14) Virella Gabriel. Introduction to Medical Immunology. Marcel Dekker. 1993 Pags.
- 15) IMMCO DIAGNOSTICS. 1996- 1997. IMMCO. pags. 2 a 21.