



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**



**LA INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA COMO TÉCNICA PARA EL
DIAGNÓSTICO EFICAZ DE LA EPIDERMÓLISIS AMPOLLAR EN EL
LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA**

**AUTORES:
ACEVEDO, JHOANA.
DELGADO, NAYARLI.
FIGUEROA, CLAUDIA.
TORRES, EDUARDO.
TUTOR:
PROF. NELLY VIGIL
AÑO: 2015**

BARBULA, MAYO DE 2016



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**



CONSTANCIA DE APROBACION

Quienes suscriben, **Profesora Mariela López, Profesor Carlos Escalona**, hacemos constar que una vez obtenidas las evaluaciones del tutor, jurado evaluador del trabajo en presentación escrita y jurado de la presentación oral del trabajo final de grado: **LA INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA COMO TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO EFICAZ DE LA EPIDERMÓLISIS AMPOLLAR EN EL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA**, cuyos autores son los bachilleres: **Acevedo Jhoana, Figueora Claudia, Delgado Nayarli, Torres Eduardo**. Presentado como requisito para obtener el título de Técnico Superior Universitario en Histotecnología, el mismo se considera APROBADO.

En Valencia a los 26 días del mes de Mayo del año dos mil dieciséis.

Sello.

Profesora: Mariela Lopez

Profesor: Carlos Escalona



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**



CONSTANCIA DE ENTREGA

La presente es con la finalidad de hacer constar que el trabajo Monográfico titulado:

**LA INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA COMO TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
EFICAZ DE LA EPIDERMOLISIS AMPOLLAR EN EL LABORATORIO DE
HISTOPATOLOGIA**

Presentado por los bachilleres:
Acevedo Jhoana C.I: 19.862.458
Delgado nayarli C.I: 20.728.496
Figueroa Claudia C.I: 20.386.957
Torres Eduardo C.I: 22.410.813

Fue leído el trabajo monográfico y se considera que cumple con los parámetros metodológicos exigidos para su aprobación. Sin más a que hacer referencia, se firma a los veintiocho días del mes de enero de 2016.

**Prof. Nelly Vigil
C.I. N° 5.383.278**

Firma



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA**



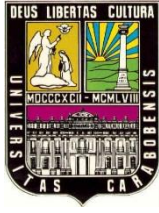
**LA INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA COMO TÉCNICA PARA EL
DIAGNÓSTICO EFICAZ DE LA EPIDERMÓLISIS AMPOLLAR EN EL
LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA**

**AUTORES:
ACEVEDO, JHOANA
FIGUEROA, CLAUDIA
DELGADO, NAYARLI
TORRES, EDUARDO
TUTOR:
PROF. NELLY VIGIL
AÑO: 2015**

RESUMEN

La inmunofluorescencia es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo hecha visible por la incorporación de un colorante fluorescente al anticuerpo y una vez hecha la reacción se expone a la luz ultravioleta emitida por el microscopio para ser evidenciada por el fenómeno de fluorescencia. Existen dos tipos de inmunofluorescencia, las cuales son importantes para la realización de la técnica en las enfermedades autoinmunes, Estos tipos son la Inmunofluorescencia directa y la indirecta. El histotecnólogo desempeña un papel importante en el laboratorio de histopatología para la realización de estas técnicas que son utilizadas para el diagnóstico eficaz de la epidermólisis ampollar, la cual es una enfermedad que se caracteriza por la formación de ampollas en la piel; estas lesiones pueden ser superficiales localizadas en la propia membrana basal epidérmica, dentro de ella o por debajo de la misma. El presente trabajo se llevó a cabo mediante el tipo de investigación documental y diseño bibliográfico. El propósito general es describir la inmunofluorescencia directa como método de elección para determinar la enfermedad. Como conclusión se puede decir que en la siguiente investigación quiere indagar sobre la epidermólisis ampollar, así como diferenciar técnicas que se emplean para el diagnóstico e identificar el procedimiento más adecuado para determinar esta patología

Palabras clave: inmunoflorescencia, epidermolisis ampollar, histopatología.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA



**LA INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA COMO TÉCNICA PARA EL
DIAGNÓSTICO EFICAZ DE LA EPIDERMÓLISIS AMPOLLAR EN EL
LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA**

AUTORES:
ACEVEDO, JHOANA
FIGUEROA, CLAUDIA
DELGADO, NAYARLI
TORRES, EDUARDO
FACILITADOR DE ASIGNATURA:
LIC. ANNA KALKANIS
TUTOR:
PROF. NELLY VIGIL

ABSTRACT

The immunofluorescence is a specialized process that is consisted in an antigen antibody reaction made visible by adding a fluorescent dye to the antibody and once added, the reaction was exposed to ultraviolet light emitted through a microscope to show evidence for the phenomenon of fluorescence. There are two types of immunofluorescence which are important for the realization of the technique in autoimmune diseases, including highlights direct and indirect. The histotechnologist plays an important role in the histopathology laboratory for performing these techniques that are used for an effective diagnosis of epidermolysis bullosa, which is a disease characterized by the formation of blisters. These lesions can be located inside the epidermal basement membrane or below it. This work was carried out by the method of documentary and bibliographic research. In conclusion, we can say that by the method of direct labeling and using a pre covalent binding of the fluorochrome with the primary antibody, only a single stage incubation with the antigen and one washing step is required.

Keyword: immunofluorescence, epidermolysis bullosa, histopathology.

INDICE

Introducción.....
Etiología de la Epidermólisis Ampollar.....
Técnica para el diagnóstico de la Epidermólisis Ampollar.....
Inmunofluorescencia Directa como método más adecuado para determinar la Epidermólisis Ampollar.....
Conclusión.....
Recomendaciones.....
Referencias Bibliográficas.....

INTRODUCCIÓN

La epidermólisis ampollar (EA) es una enfermedad que se caracteriza por formación de ampollas en la piel, estas lesiones pueden ser superficiales localizada en la propia membrana basal epidérmica, dentro de ella o por debajo de la misma. Esta enfermedad es hereditaria y afecta 1 de cada 50.000 a 100.000 neonatos en el mundo.

Una de las técnicas más importantes para el diagnóstico de la epidermólisis ampollar ya sea prenatal o al momento del nacimiento, es la inmunofluorescencia directa (IFD) que se encarga de anclar antígenos con anticuerpos mediante un fluorocromo (sustancia fluorescente) que reacciona a la luz ultravioleta cuando es positivo (1). Otra de las técnicas de inmunofluorescencia es la indirecta (IFI) también es muy utilizada y de gran importancia en los estudios de autoinmunidad debido a su fácil manejo y estandarización. Sin embargo, la lectura e interpretación requieren de amplia experiencia. La técnica se basa en el reconocimiento de los anticuerpos que identifican estructuras antigénicas celulares nativas (2). También es de gran importancia la microscopía electrónica debido a que puede determinar tanto el nivel del plano de despegamiento epitelial como las alteraciones ultraestructurales de las proteínas afectadas (filamentos de queratina, desmosomas, hemidesmosomas, fibrillas de anclaje y filamentos de anclaje), cuyo número o apariencia se ve alterado en los diferentes subtipos de epidermólisis ampollar; en la actualidad existen pocos laboratorios con la experiencia necesaria para realizar un diagnóstico fiable de epidermólisis ampollar y se prevé que el uso de esta técnica disminuirá con el tiempo aunque su aplicación en la investigación es fundamental (3). La epidermólisis ampollar es una enfermedad que da lugar a una serie de problemas como lo es el impacto y rechazo de la sociedad debido al desconocimiento y poca información, también a esto se le atribuye los problemas psicológicos tanto en la familia como en el paciente dado que el nacimiento es una felicidad y se ensombrece ante la perspectiva de una existencia de sufrimiento para el niño a lo largo de su vida, debido a que esta enfermedad es congénita ya que existe una alteración genética la cual transmiten los padres o algún antecedente familiar al feto. Es una etapa de total desesperación para los familiares y que sin embargo, tienen

que prestar todo su apoyo al paciente afectado con epidermólisis ampollar ya que este no podrá llevar una vida totalmente normal (1).

El histotecnólogo desempeña un papel fundamental en el diagnóstico de epidermólisis ampollar, preparando estos tejidos para su examen microscópico mediante procesos químicos que incluyen fijación, deshidratación, impregnación, inclusión en parafina, microtomía y tinción celular. Ciertas técnicas de coloración involucran anticuerpos que reaccionan con líneas tumorales específicas, siendo algunas de ellas conocidas como la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, las cuales son las técnicas más recomendables para determinar los tratamientos apropiados (4) aplicando correctamente las normas de bioseguridad en el laboratorio de anatomía patológica.

La epidermólisis ampollar consiste en la formación de ampollas ante el menor traumatismo que afectan a la piel y las mucosas. Esta enfermedad empeora seriamente la calidad de vida. El diagnóstico se realiza principalmente por mapeo por inmunofluorescencia y microscopía electrónica. El tratamiento es sintomático, aunque se están investigando nuevas terapias celulares y moleculares de ingeniería genética (3).

Uno de cada 50.000 recién nacidos padece Epidermólisis Bullosa a nivel mundial (5), en Latinoamérica se desconocen las cifras de cuantas personas padecen esta enfermedad y así mismo, Venezuela carece de una data donde se pueda obtener información relevante sobre dicha enfermedad debido a la escasa existencia de trabajos de investigación dirigidos a esta afección que cursa con elevada mortalidad, por esto, es necesario ampliar el conocimiento de esta patología.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto los investigadores del presente trabajo monográfico se formulan la siguiente interrogante. ¿Qué aportes puede generar la inmunofluorescencia y en especial la inmunofluorescencia directa como técnica para el buen diagnóstico de la epidermólisis ampollar?

Para dar respuesta a la interrogante de investigación, se plantean los siguientes propósitos: indagar la reseña y características de la epidermólisis ampollar. Diferenciar las técnicas que se emplean para el diagnóstico y por ultimo identificar el procedimiento más adecuado para determinar la patología. El propósito general de esta investigación es describir la inmunofluorescencia directa como un diagnóstico eficaz que sirva de

base a futuras investigaciones sobre la epidermólisis ampollar, enfermedad que afecta tanto en lo físico, psicológico y social a los pacientes que la presenten.

Esta investigación aporta beneficios a aquellas personas que desconocen sobre la epidermólisis ampollar así como las técnicas que se utilizan para su diagnóstico, debido a que se encuentran dificultades para conocer la enfermedad, no sólo a través de los canales públicos de información, sino también a través de los profesionales, que en ocasiones carecen de la experiencia necesaria para ofrecer respuestas y soluciones a sus demandas, conviene destacar que el apoyo social no evitará que estos pacientes presenten la enfermedad, pero puede ayudar a minimizar algunos de sus problemas, simplemente colaborando con los esfuerzos que se realizan para mejorar la información. Los afectados carecen de ayuda gubernamental tanto en espacios públicos como al acceso de medicamentos que mejoren estas complicaciones o tratamientos preventivos para disminuir la severidad de lesiones cutáneas, debido a que estos son de altos costos para las personas con bajos recursos.

El presente trabajo monográfico representa un tipo de investigación documental con un diseño bibliográfico ya que se fundamenta en la revisión sistemática, rigurosa y profunda de material documental de cualquier clase. En este trabajo se utilizaron documentos de los cuales se recolectaron, seleccionaron, analizaron y presentaron unos resultados totalmente coherentes (6).

Para el presente trabajo monográfico se empleó como antecedente de investigación que lleva por título “Mapeo por inmunofluorescencia en epidermólisis ampollosa (bulosa) (EB) hereditaria: un estudio de 86 casos de la India”, publicado en el año 2014 por Kubba A, Bansel S, Jerajani H. Es un tipo de investigación pre- experimental con un diseño experimental. Su principal objetivo fue describir los patrones de tinción MFI en las diversas formas de EB en pacientes y correlacionar estos resultados con diagnóstico clínico. Se realizó un estudio transversal de los resultados del MFI en EB. Ochenta y seis pacientes con un diagnóstico de EB se incluyeron en el estudio. Había 29 con EB simple (EBS), 18 con EB unión o *juncional* (JEB) y 15 con EB distrófica (DEB). Los 24 casos restantes incluyeron variantes raras, casos de superposición de las características clínicas y los casos en que el tipo de EB no se conocía. (7) Esta investigación se empleó como antecedente debido a que se utiliza el método de

diagnóstico de la inmunofluorescencia, la cual es una técnica que se emplea para colorear la muestra obtenida y así observar mejor el resultado para el que médico patólogo pueda diagnosticar.

Para el presente trabajo monográfico también se empleó como antecedente la investigación que lleva por título: “El espectro clínico e histopatológico de la epidermólisis ampollar adquirida. Reporte de tres casos”, publicado en el año 2000 por los docentes y doctores Elizabeth Ball, Elena Muriel, Omaira Camejo, Francisco González. Adriana Calebotta del servicio de dermatología del Hospital Universitario de Caracas. Es un tipo de investigación Pre-experimental con un diseño experimental. Se evaluaron 188 historias clínicas de pacientes con enfermedades ampollares que acudieron a la consulta entre 1982 y 1997. Se seleccionaron tres posibles casos de EAA; a estos pacientes se les había realizado historia clínica, biopsia de piel lesional con tinción de H/E e IFD de piel perilesional con la técnica de inmunofluorescencia y microscopía electrónica, utilizando Ac anti IgG, IgM, IgA y C3. La EAA es una enfermedad de amplio espectro clínico. Afecta adultos entre la cuarta y quinta década de la vida. Cerca del 50% de los pacientes presentan lesiones tipo penfigoide ampollar (PA), con vesículas y ampollas tensas, sobre piel eritematosa e incluso habones. (8) Esta investigación se empleó como antecedente ya que guarda relación y aporta datos teóricos importantes, en ella el método diagnóstico fueron biopsias las cuales los histotecnólogos se encargan de procesar y estudiar para que el médico patólogo pueda dar el diagnóstico correcto.

Etiología de la Epidermolisis Ampollar

El término epidermolisis ampollosa (EA) (EB, por sus siglas en inglés *Epidermolysis Bullosa*) empleado por primera vez por Koebner en 1886 describe un grupo de enfermedades genéticas, clínicamente heterogéneas, caracterizadas por la aparición de ampollas, erosiones y úlceras en piel y mucosas, secundarias al mínimo traumatismo o de aparición espontánea, razón por la que también se les denomina enfermedades mecano-ampollosas (9)

La epidermolisis ampollosa hereditaria (EAH), incluye una serie de procesos de base genética cuyo rasgo común es la facilidad para desarrollar ampollas por trauma o roce, también se le denomina niños con “piel de cristal” o “piel de mariposa”. El rasgo clínico fundamental es la presencia de ampollas que aparecen con mayor facilidad de lo que correspondería a los traumatismos o roces responsables. El cuadro comienza desde el nacimiento o más adelante en la vida, siendo en general de peor pronóstico cuanto más precoces. Se producen por alteraciones, hoy conocidas, en proteínas que intervienen en la unión de la epidermis con la dermis (10).

Las epidermolisis ampollosas congénitas pueden heredarse ambos patrones genéticos: recesivo y dominante, y probablemente representan las enfermedades ampollosas genéticas más comunes. Todas ellas presentan, en diferente grado de afección, ampollas y úlceras en piel y mucosas al mínimo traumatismo, de ahí su nombre de enfermedades mecano - bulosas. Estas han sido divididas en forma general en tres grupos: simples, de unión y distróficas. En las formas simples la separación se forma por fractura debido a mutaciones en los filamentos de citoqueratinas 5 y 14 localizadas en la porción inferior de los queratinocitos basales de la epidermis. En las formas de unión y debido a mutaciones en la lámina 5, la ampolla se localiza en la lámina lúcida de la membrana basal epidérmica. Finalmente, las formas distróficas son por mutaciones en el colágeno VII, que forma las fibrillas de anclaje de la sub-lámina densa. Es imposible diferenciar al nacimiento el subtipo de epidermolisis, pues las tres formas muestran las mismas características: áreas de piel denudadas, erosiones y ampollas en la piel y mucosas (11).

A lo largo de la vida el patrón normal de la unión dermo-epidérmica se pierde de manera gradual, además de que se inicia con una disminución en los mecanismos de regulación inmune, provocando un incremento en la producción de autoanticuerpos y por lo tanto en las enfermedades autoinmunes. Las enfermedades ampollosas como la epidermólisis son el resultado de una respuesta inmune anormal contra las proteínas de los desmosomas o de la membrana basal (12).

Se describen en esta patología: sobreinfección, anemia, afectación de la semimucosa labial con disminución de la apertura (microstomía), afectación gingival y del tubo digestivo: desnutrición, odinofagia por lesiones orofaríngeas y esofágicas leves a severas con evolución a la disfagia y afagia por estenosis esofágica, oftalmológicas, erosiones corneales y conjuntivitis cicatrizal. Complicaciones otorrinolaringológicas como otitis externa y estenosis de los conductos auditivos externos; ortopédicos: lesiones cicatrizales en manos (pseudosindactilia), resorción ósea de falanges distales, trastornos posturales y de la marcha (posiciones antálgicas). Dermatológicas: cicatrices extensas, fibrosis, carcinoma espinocelular que es la mayor causa de muerte en estos pacientes y en especial en la forma distrófica recesiva; ginecológicas como adherencias vulvares y urológicas: estenosis uretral (13).

En la forma EA simple el primer cambio histológico que se observa es la vacuolización de los queratinocitos basales (citólisis). El plano de clivaje se produce a este nivel, por ello pueden quedar remanentes de los queratinocitos en el suelo de la ampolla, acompañando a la membrana basal. Con la prueba de inmunoperoxidasa se pueden evidenciar en el suelo de la ampolla por la tinción positiva para queratina y colágeno IV o laminina. En las lesiones evolucionadas la imagen es de una ampolla subepidérmica. El estudio ultraestructural demuestra el lugar del clivaje. La EA hemidesmosómica (pseudojuncional) se presenta histológicamente como una ampolla subepidérmica sin inflamación. La EA juncional aparece como una ampolla subepidérmica con mínimo componente inflamatorio linfocitario. La membrana basal se localiza en el suelo de la ampolla. Ultraestructuralmente se demuestra que el nivel de separación está en la lámina lúcida. Indistinguible de la juncional; la EB distrófica (dermolítica) también se presenta como una ampolla subepidérmica con mínimo o ausente infiltrado inflamatorio. En las formas evolucionadas se ve fibrosis de la dermis superficial. La membrana basal

se localiza en el techo de la ampolla lo que puede ponerse en evidencia por inmunohistoquímica o por estudio de microscopía electrónica. Se propone un mecanismo no inflamatorio para la formación de las ampollas, ya que estas aparecen en sitios de trauma y algunas muestran escaso contenido de células inflamatorias, además de una disminución de las fibrillas de anclaje en piel aparentemente sana (10,13).

La mayoría de las complicaciones de este grupo heterogéneo de enfermedades vienen determinadas por los mecanismos de reparación de las ampollas y por la localización de las mismas (tanto anatómica como histológica). En un extremo estarían las formas simples, con escasas complicaciones y, en el otro, las formas distróficas, gravemente mutilantes e invalidantes. La sobreinfección bacteriana es la principal complicación de todas las formas de EB. Las ampollas constituyen un caldo de cultivo excelente para microorganismos, sobre todo bacterias, que son capaces de ensombrecer el pronóstico estético, ya que determinan una cicatrización mucho más anómala e incluso el pronóstico vital por el riesgo de sepsis. La realización de una exploración cuidadosa, atendiendo al aspecto de las lesiones, su olor, presencia de dolor, febrícula o fiebre, permitirán la sospecha de infección.

Las palmas y plantas son las más afectadas, con la formación de ampollas serohemáticas que, aunque normalmente no dejan cicatriz, cuando aparecen muy precozmente, en los primeros meses de vida pueden observarse cicatrices atróficas residuales. Debe evitarse la sobreinfección bacteriana de las ampollas, ya que es ésta la principal complicación en estos pacientes. También es frecuente la coexistencia de hiperhidrosis, factor predisponente a la formación de nuevas lesiones bullosas. La afectación ungueal es rara, y sólo aparece en algunos casos de EBS, como las EBS con pigmentación moteada, en la que las uñas aparecen engrosadas y curvadas, con los consiguientes problemas funcionales para el paciente.

La complicación más importante es la malnutrición energético-proteica. Esta malnutrición está en relación directa con el grado de afectación de la EB. Es producto de una inadecuación entre el aporte de nutrientes y el gasto o pérdida de los mismos. La disminución de la ingesta se debe fundamentalmente a:

- **Úlceras bucales:** Las úlceras bucales pueden ser esporádicas (EBS) o estar presentes en la gran mayoría de los pacientes con EBD. La masticación de los alimentos se verá dificultada por el dolor que provocan sobre dichas úlceras
- **Restricción de la apertura de la boca o microstomía:** Es secundaria a la cicatrización de las ampollas labiales y a la fibrosis sinequante de las ampollas retrocomisurales y de las que aparecen en los fondos vestibulares de la boca.
- **Anquiloglosia:** Sucede cuando se pega la mucosa lingual a la mucosa del fondo de la boca. Por ello estará dificultada la protrusión de la lengua, la deglución y la fonación, principalmente en la EBD severa.
- **Alteraciones dentales:** Presentes principalmente en la EB severa (EBJ y EBD). Esta complicación consiste en la presencia de un excesivo número de caries y sus complicaciones infecciosas y dolorosas, quedando muy limitada la masticación.
- **Patología esofágica:** Es muy frecuente en estos pacientes y consiste en:
 - **Disfagia:** Se ha objetivado la presencia de disfagia sin la existencia de alteraciones orgánicas de estenosis o membranas.
 - **Expulsión de moldes esofágicos:** Por retención de restos y detritus
 - **Estenosis esofágica:** Es secundaria a la cicatrización de las heridas. Todos presentan disfagia.
 - **Membranas esofágicas:** Es poco frecuente. Se localizan a nivel del cartílago cricofaríngeo. Se asocian a la expulsión de moldes esofágicos (1).

Técnicas para el diagnóstico de la Epidermólisis Ampollar

Una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de la epidermólisis ampollar es la inmunofluorescencia o técnica de anticuerpos fluorescentes es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno - anticuerpo hecha visible por la incorporación de un colorante fluorescente al anticuerpo, y una vez hecha la reacción, se expone a la luz ultravioleta emitida por el microscopio para ser evidenciada por el fenómeno de fluorescencia. El desarrollo de la inmunofluorescencia precisa de un equipo que consta de un buen microscopio provisto de un condensador de campo oscuro, de una fuente luminosa especial con un bombillo de mercurio que produzca luz ultravioleta y de varios filtros específicos. Por lo tanto, cada sistema está constituido por

un filtro que suministra luz a una cierta longitud de onda para excitar al fluorocromo y un segundo filtro barrera para excluir la luz excitante, que permite la transmisión de la iluminación fluorescente, de mayor longitud de onda. La fluorescencia alcanza la máxima excitación a 490nm y emite luz fluorescente alrededor de 520nm. Las lámparas más utilizadas para lograr una buena estimulación son las de tungsteno o de mercurio de alta presión. De las dos la de mercurio es la mejor. Los microscopios de luz incidente son los más modernos y se prefieren para realizar muchas técnicas inmunofluorescentes. En la actualidad estas técnicas se aplican con éxito en la investigación de gran cantidad de microorganismos, para lo que se usa la inmunofluorescencia directa, y en la determinación de anticuerpos específicos contra estos microorganismos, en donde la inmunofluorescencia indirecta tiene mayor aplicación (13).

El sitio adecuado para tomar la biopsia de piel en un paciente con sospecha de EA congénita es preferentemente la zona perilesional sana de una ampolla reciente. En los casos en que no se encuentre una ampolla reciente debe friccionarse la piel sana con un borrador durante 2min con el fin de producir una ampolla nueva. El propósito de tomar una biopsia reciente o inducida es evitar los cambios en las proteínas estructurales secundarios a la propia herida y al proceso inherente de cicatrización (13). La muestra de piel debe ser inmediatamente colocada en solución de Michel descrita originalmente por Michel et al en 1973 y modificada por Vaughan et al en 1995 (2,5ml de amortiguador de citratos a un pH de 7,4, con una concentración de 1M, 5ml de sulfato de magnesio a una concentración de 0,1M, 5ml de N-etilmaleimida a una concentración de 0,1M, 55g de sulfato de amonio, diluido en 87,5ml de agua, para un volumen total de 100ml ajustado a un pH de 7,4 con un 1M de hidróxido de sodio) En este medio las muestras pueden ser almacenadas durante 28 días a temperatura ambiente para ser enviadas a un laboratorio especializado en cualquier parte del mundo para realizar el mapeo antigénico. De forma previa a cortar la muestra, esta debe ser lavada en una solución salina amortiguada por fosfatos por varias horas para mejorar la sensibilidad diagnóstica. Después, las muestras pueden ser cortadas en criostato para posteriormente teñirlas (13).

Los anticuerpos primarios para realizar la técnica de mapeo por inmunofluorescencia cutánea tienen diferentes orígenes animales (rata, ratón, conejo), los cuales se fijan a las proteínas estructurales específicas en la piel que deseamos estudiar. Los anticuerpos que podemos utilizar para el mapeo antigénico están dirigidos contra citoqueratina 5, citoqueratina 14, plectina, integrina $\alpha 6$ y $\beta 4$, colágeno tipo xvii (180kD PBAG2), laminina 332 (anteriormente conocida como laminina 5) con sus tres cadenas $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ y finalmente colágeno tipo vii. Para una mejor visualización del nivel de la ampolla, especialmente en pacientes con EA distrófica, se utilizan adicionalmente anticuerpos contra colágeno tipo iv (presente en la lámina densa de la unión dermo-epidérmica). Todos los primeros anticuerpos son de clase IgG y la mayoría de ellos son monoclonales y están desarrollados en ratón. Por lo tanto, el segundo anticuerpo debe estar dirigido hacia el anticuerpo IgG, normalmente conjugado con una partícula de fluorescencia isotiocianato (FITC). Una excepción es el anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$, el cual se desarrolla en rata, por lo que el segundo anticuerpo es de tipo IgG anti-rata. La partícula FITC se conjuga con el segundo anticuerpo y produce una señal específica de fluorescencia en un rango de 450–490nm, lo que permite la visualización del anticuerpo específico unido a la proteína en estudio que se desea visualizar en el microscopio de fluorescencia (13).

Dependiendo de la frecuencia de utilización de la inmunofluorescencia y la dilución final necesaria para la técnica, los anticuerpos deben ser almacenados en cantidades que permitan la preparación en fresco del total de las muestras en cada sesión, con la finalidad de mantener los anticuerpos en congelación hasta la fecha de caducidad y evitar contaminación. (13). Durante la técnica de tinción para el mapeo por inmunofluorescencia se recomienda utilizar de 3 a 4 cortes de cada muestra, cada uno de 4–6 μ de grosor, así como 1–2 cortes de piel, provenientes de pacientes sanos que se utilizaran como controles positivos. Esto permite obtener un punto de referencia de la inmunofluorescencia de las proteínas estructurales en estudio, para posteriormente comparar la inmunoreactividad de las proteínas del control sano con la inmunoreactividad de las proteínas de los pacientes con EA. De acuerdo al número de anticuerpos a determinar se preparan igual número de laminillas para la tinción de las posibles proteínas involucradas. Dos de estas laminillas sirven como controles

negativos, con la finalidad de evaluar y excluir la inmunoreactividad no específica causada por el segundo anticuerpo:

1. Las laminillas se incuban en solución salina amortiguada por fosfatos (SSAF) con el primer anticuerpo correspondiente,
2. luego será incubada con el segundo anticuerpo con las partículas de FITC contra ratón conjugado o contra rata.
3. Cada laminilla es incubada con la dilución apropiada para el primer anticuerpo (SSAF en el caso del control negativo) durante 30min en una cámara húmeda a temperatura ambiente.
4. Después, las muestras se lavan en SSAF en dos ocasiones por 15min.
5. Con la dilución apropiada del segundo anticuerpo se incuban por 30min en las mismas condiciones (13).
6. Posteriormente, las muestras deben lavarse nuevamente dos veces en SSAF por 15min.
7. Inmediatamente cubrir con glicerol y cubreobjetos.
8. Finalmente en el microscopio de fluorescencia, se observa y se toma fotografías del patrón y reactividad de la fluorescencia, para ser archivadas en el expediente de cada paciente. Esta técnica logra ser estable por varias semanas cuando se mantienen en refrigeración a 4°C (13).

En el mapeo antigénico por inmunofluorescencia es posible visualizar la localización y expresión de las proteínas estructurales involucradas en la patogénesis de las diferentes formas de la enfermedad, así como el posible sitio de separación y/o formación de la ampolla. Sin embargo, la intensidad de la tinción de las proteínas es influenciada por varios factores como son la parte del cuerpo de la que se obtuvo la piel (normal o piel afectada), la exposición solar previa, así como y la edad de los pacientes. Para realizar una adecuada correlación entre piel afectada y el control sano, es indispensable tomar cortes de piel de pacientes de la misma edad y partes del cuerpo que los controles. Además el tiempo de almacenaje en la solución de Michel (preferentemente no más de 28 días), las condiciones de transporte (altas temperaturas, congelación-descongelación) o las condiciones de almacenaje de los anticuerpos pueden influenciar los resultados de la técnica de inmunofluorescencia.

Para evaluar los resultados de la tinción es útil hacer una escala del 1–4 de acuerdo a la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo, donde (+) es intensidad dudosa, (++) intensidad débil, (+++) moderada intensidad, (++++) muy brillante. Como se mencionó con anterioridad, es de gran importancia tener una ampolla en la biopsia, ya que esto podrá permitir visualizar el nivel en la piel en la que aparece la separación. En el caso de EAS, al utilizar por ejemplo el anticuerpo para el colágeno iv (presente en la lámina densa de la unión demo-epidérmica) se encuentran ampollas intraepidérmicas, localizadas en el nivel de los queratinocitos basales: en estos casos observaremos que la fluorescencia, situada en la lámina densa, permanece en el suelo de la ampolla junto a restos de queratinocitos basales unidos a la membrana basal. Cuando estudiamos lesiones de EA de unión suelen utilizarse en el mapeo antigénico, anticuerpos frente a colágeno iv y lamininas en las técnicas de inmunofluorescencia. En estos casos observaremos que la fluorescencia se encuentra en el piso de la ampolla, aunque en el caso de las citoqueratinas el marcaje únicamente se encuentra en el techo de la ampolla. Finalmente, en los casos de EA distróficas los estudios de mapeo suelen realizarse con anticuerpos dirigidos frente a citoqueratinas, colágeno iv y lamininas. De esta manera, observaremos que la fluorescencia se localiza solo en el techo de la ampolla. En cada tipo y subtipo de la enfermedad se pueden distinguir diferentes proteínas alteradas de la piel. Por otro lado la expresión de estas proteínas, puede llegar a ser igual a los controles, reducida en intensidad o completamente ausente. El mapeo antigénico por inmunofluorescencia es el procedimiento de elección para el diagnóstico preliminar y clasificación posterior de los diferentes tipos de EA. Los patrones de inmunofluorescencia, (para determinar el nivel de la formación de ampollas y visualizar la expresión de proteínas específicas) identifican las proteínas involucradas en la fisiopatología de la enfermedad. Aunque la identificación de los genes alterados en cada paciente es el criterio definitivo para el diagnóstico de la enfermedad, el mapeo antigénico permite evaluar en un primer momento la expresión de las proteínas epidérmicas y localizar así la zona de la epidermis alterada. Posteriormente, deberemos realizar estudios moleculares que nos permitan realizar un diagnóstico definitivo al analizar las mutaciones en las proteínas estructuralmente alterada. La inmunofluorescencia es la primera herramienta de laboratorio de utilidad para brindar

asesoramiento a los padres y pacientes acerca del pronóstico clínico, fenotipo e historia natural de la enfermedad, con la ventaja de obtener el resultado el mismo día que se realiza la biopsia. Además, esta técnica puede realizarse más fácilmente en los hospitales, al no requerir técnicamente tanta preparación como la ME. La disponibilidad de medios de fijación de los tejidos (como la solución de Michel) que permiten además su transporte a centros especializados en esta patología, puede ayudar a los médicos que atienden a pacientes con EA, para poder realizar un primer diagnóstico de la enfermedad (13).

Inmunofluorescencia Directa como método más adecuado para determinar la Epidermólisis Ampollar

Es útil para hallar antígenos directamente en la muestra, para lo cual emplea anticuerpos de gran especificidad contra el determinante antigénico que se va a estudiar, marcados con la sustancia fluorescente. El anticuerpo es obtenido a través de la inoculación del microorganismo productor del antígeno en un modelo animal. La inmunofluorescencia directa, es decir con anticuerpos conjugados con fluoresceína, se aplica corrientemente en el diagnóstico de las enfermedades cutáneas en donde tiene indicación y utilidad muy precisas como en enfermedades ampollares, vasculitis y colagenopatías entre otras. Esta técnica pese a ser muy sensible, presenta inconvenientes como la falta de permanencia de la fluorescencia, requiere de microscopía especializada y el detalle morfológico es pobre. Para documentar cada caso, es necesario fotografiar la reacción. (14,15)

Ventajas de la Inmunofluorescencia

- La principal ventaja de esta consiste en la rapidez con la que se obtiene los datos. En la mayor parte de los casos, el resultado puede ser dado el mismo día en que se toma la muestra.
- los cultivos y pruebas biológicas pueden ser omitidas.
- pequeñas cantidades de organismos o antígeno se encuentran fácilmente, aun en muestras muy contaminadas.
- en estos procedimientos no es necesaria la esterilidad.

- la posibilidad de dar un diagnóstico, aun con organismos no viables es alta.
- la inmunofluorescencia se usa no solo en la identificación de los microorganismos, sino también en muchos otros estudios relacionados con la inmunología (14).

Desventajas de la inmunofluorescencia

- el costo del reactivo y de los equipos es alto. Sin embargo una vez establecidos estos métodos en forma rutinaria, el ahorro de tiempo y material recompensa el gasto inicial.
- Requiere de personal especializado y debidamente entrenado.
- Como cualquier otra técnica serológica, los resultados no son 100% específicos, pero como todas ellas, son una ayuda efectiva para el diagnóstico (14).

La importancia de que un histotecnólogo conozca todas estas técnicas y esté presente en las instituciones donde se practican operaciones quirúrgicas radica en que el patólogo necesita evaluar de inmediato el tejido obtenido en la cirugía, en especial cuando el diagnóstico anatomopatológico instantáneo puede determinar el paso siguiente en la operación. Por ejemplo, es muy frecuente que un cirujano solicite una biopsia por congelación en el quirófano cuando no cuenta con diagnósticos preoperatorios certeros o debe identificar hallazgos intraoperatorios inesperados. Adicionalmente, es posible que el cirujano quiera saber si se ha extirpado toda la masa patológica dentro del límite del tejido sano y si el borde de la sección quirúrgica está libre de tejido enfermo. Muchas veces, el tiempo total que transcurre desde la toma de la biopsia hasta la obtención de resultados depende sobre todo del tiempo de transporte del tejido desde el quirófano hasta el laboratorio de patología más cercano de la técnica histológica utilizada y de la experiencia del patólogo, por lo que es de suma importancia que existan servicios de éstos en las principales instituciones de salud y con personal altamente capacitado para actuar de la forma más eficiente posible (4)

CONCLUSIÓN

Tomando en consideración el propósito de la investigación y sobre la base del fundamento teórico, se obtuvieron las siguientes conclusiones que confirman la investigación.

La epidermólisis ampollar es una enfermedad congénita que afecta a 1 de cada 50.000 a 100.000 neonatos en el mundo, se caracteriza por la formación de ampollas cutáneas al más mínimo roce o trauma, estas se localizan en la membrana basal o por debajo de la misma siendo el resultado de una respuesta inmune anormal contra las proteínas de los desmosomas.

El uso de marcadores fluorescentes en un ensayo de inmunofluorescencia proporciona tanto la detección directa o indirecta del antígeno. Con la detección directa, el marcador fluorescente está unido a través de un enlace covalente al anticuerpo primario que reacciona directamente con el antígeno en secciones de tejido. Por otro lado, en la detección indirecta, el marcador se une covalentemente a un anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario durante el inmunoensayo. Otro método de diagnóstico importante es la microscopía electrónica ya que esta determina tanto el nivel plano de despegamiento epitelial como las alteraciones ultra estructurales de las proteínas afectadas lo cual permite diferenciar los subtipos de epidermolisis ampollar.

El procedimiento más adecuado para el diagnóstico de la epidermólisis ampollar es la inmunofluorescencia directa, debido a la rapidez en la que se obtienen los datos y se pueden obtener los resultados el mismo día que se haya tomado la muestra, debido a la afinidad que tienen los anticuerpos de unirse al antígeno marcados con fluorocromo . El marcador fluorescente generalmente produce una sustancia colorada o un aumento en la cantidad de luz emitida a una longitud de onda determinada, si el antígeno está presente. En el caso de ausencia de antígeno, no hay unión del anticuerpo primario marcado y por lo tanto no hay señal.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a lo anteriormente expuesto en este trabajo monográfico se sugiere:

Difundir los resultados de esta investigación entre la comunidad docente y estudiantil, para dar a conocer a la epidermolisis ampollar, los síntomas que produce y el método de diagnóstico que se debe utilizar para el estudio de esta patología.

Se sugiere a la dirección de escuela de ciencias biomédicas y tecnológicas innovar la cátedra que incluya prácticas en el laboratorio de la técnica de inmunofluorescencia mediante la incorporación de nuevas estrategias que generen en los estudiantes aprendizajes significativos sobre la realización de este método.

Incluir en los proyectos educativos de aprendizaje, el uso de la técnica de inmunofluorescencia en los laboratorios de histotecnología.

Se plantea que el docente profundice sobre el uso adecuado de la técnica de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico eficaz de la epidermolisis ampollar.

Ejecutar talleres de capacitación y actualización en el diseño de estrategias de aprendizajes innovadoras basadas en la inmunofluorescencia como medio efectivo para fomentar el nivel de educación para los histotecnólogos.

Proponer a la facultad de ciencias de la salud una investigación orientada a la búsqueda de soluciones para la integración de una materia que explique de forma detallada el uso y desarrollo de la inmunofluorescencia. De manera que los estudiantes de histotecnología puedan disfrutar de los beneficios y alcances de la técnica en su formación integral.

REFERENCIAS

1. C Baquero, E Herrera, J.C López, R De Lucas, R, Javier, C Serrano, et al. Guía de atención clínica integral de la epidermólisis bullosa hereditaria. Ministerio de sanidad y consumo. 2008:13-95. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/profesionales/prestacionesSanitarias/publicaciones/docs/epidermolisisBullosa.pdf>
2. Diego F.Hernandez Ramirez, Javier Cabiedes. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Reumatología Clínica. 2010; 6:173-7. - Vol. 06 Núm.03. disponible en: <http://www.reumatologiaclinica.org/es/tecnicas-inmunologicas-que-apoyan-el/articulo/13149602/>
3. C Siañez, R Pezoa, J.C salas. Epidermólisis ampollosa congénita: revisión del tema. Actas Dermo- Sifilográficas. Año 2009; 100(10):842-56. disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/epidermolisis-ampollosa-congenita-revision-del/articulo/13145682/>
4. Molina A., Bélgica, Reyes T., María Celeste, Sánchez Maya, Alejandro. Bases curriculares para la propuesta de creación de la licenciatura en histotecnología en la universidad central de Venezuela. Caracas, 26 de julio de 2013. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/8469/1/Completo.pdf>
5. Takane T. Juan, Aguirre Maria.L, Daza Rene. E, Blancas. M Yonathan. L. Epidermólisis Ampollar distrofica presentación de un caso. Año 2012/ VOL. LXIX NO. 2. P.P. 83-90. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2012/od122h.pdf>
6. Palella, S. Y Martins, F. metodología de la investigación cuantitativa. 2006. Caracas-venezuela. Editorial FEDUPEL.

7. Hiremagalore R1, Kubba A, Bansel S, Jerajani H. Mapeo por inmunofluorescencia en heredado epidermólisis ampollosa: un estudio de 86 casos de la India. 2015 Feb; 172(2):384-91. doi: 10.1111/bjd.13305. Epub 2014 Dec 23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070151>
8. Elizabeth Ball, Elena Muriel, Omaira Camejo, Francisco Gonzalez, Adriana Calebotta. El espectro clínico e histopatológico de la epidermólisis ampollar adquirida. Reporte de tres casos. Dermatología venezolana. 2000. VOL 38. Nro4. Disponible en: <https://www.google.co.ve/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fsvderma.org%2Frevista%2Findex.php%2Fois%2Farticle%2Fdownload%2F355%2F355&ei=hPhKVZWIFcrVsAW4qoCQDg&usq=AFQjCNEWq7xxyx55YfutTNUcmhvKpbzpEQ&sig2=KPbo3jeiFOUeIGgfNokWow>
9. R. Cepeda-Valdés, G. Pohla-Gubo, J.R. Borbolla-Escoboza, O. Barboza-Quintana, J. Ancer-Rodríguez, H. Hintner, et al. Mapeo por inmunofluorescencia para el diagnóstico de epidermólisis ampollosa congénita. Año 2010; 101:673-82 - Vol. 101 Núm.08. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/mapeo-por-inmunofluorescencia-el-diagnostico/articulo/13156136/>
10. E. Herrera, A. Sanz, R.J. Bosch. Tema 39 Epidermolisis Ampollosa Hereditaria. Disponible en: <http://www.menarini.es/images/dermatopatologia/Derma039.pdf>
11. Salas. Julio.C, Mcgrath. John.A, La epidermólisis bullosas distrofas en México. Año 2006. Gac. Méd. Méx vol.142 no.1 México. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132006000100005
12. De Reno.O. Josefina, Mirelte.J, Chavez.B. Itzel. Epidermolisis Bullosa Adquirida lo nuevo en Biología Molecular. Año 2011. Vol. 20, Núm. 2. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derma/cd-2011/cd112b.pdf>
13. Caballero.G, Castro.M, Fernández. L, Fuentes Ana.M, Gómez.K, Guecaimburu.R. guía clínica diagnóstico y tratamiento epidermólisis ampollar. Instituto de seguridad Social. Año 2014. Disponible en: http://www.bps.gub.uy/innovaportal/file/8964/1/guia_clinica_epidermolisis_bullosa.pdf

14. Fiorentino S.G, Rueda. N.Susana. A, Gutiérrez Maria. F. la inmunología en el diagnóstico clínico. Colección textos y manuales. Editorial Javeriano. Año 1994.

Disponible en:

http://books.google.co.ve/books?id=R3Hn3NMt0zsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

15. Manual de Patología General. Inmunohistoquímica. Capítulo 6. Técnicas diagnósticas en histopatología. Universidad Católica de Chile. Disponible en:

http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol_125.html