

Ingrés d'Acadèmics corresponents

NO ÉS OR TOT EL QUE BRILLA: TÈCNIQUES D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA EN L'ESTUDI DE LES MALALTIES CUTÀNIES

Josep Manuel MASCARÓ GALY

Consultor del Servei de Dermatologia Hospital Clínic de Barcelona.

Professor Titular de Dermatologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Excel·lentíssim Senyor President de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya, Molt il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics, Senyores i Senyors. El haver estat nomenat Acadèmic Corresponent de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya no només es un gran honor per mi, sinó que té un gran valor emotiu i personal pel fet de que vàries generacions de la meua família han estat membres d'aquesta venerable institució, i com a testimoni d'això està que la persona que em fa l'acollida, es el meu pare que es Acadèmic Numerari. Espero fer-me mereixedor de la confiança que han dipositat en mi tots vostès. Moltíssimes gràcies.

Abans de començar a llegir el meu treball vull també agrair a tots els que han fet possible la meua trajectòria. En primer lloc a la meua família, la meua esposa, la doctora Eulàlia Baselga i els nostres fills Anna, Pau, Marta, Patricia i Elena, alguns dels quals ja son estudiants de Medicina, i els meus pares Josep Maria, Catherine i Helena. En segon lloc, als meus mestres. Vull assenyalar sobretot al Professor Josep Maria Mascaró Ballester que em va guiar en el camp de la Dermatologia i la Dermatopatologia, i al Professor Luis Diaz als Estats Units que em va guiar en el camp de la Immunologia i de les Malalties Autoimmunes de la pell. No hi ha res en aquesta vida que pugui marcar tant una persona com la força d'un model. Els puc afirmar que els meus models han estat per a mi uns extraordinaris referents de grandesa científica i han condicionat molt el tipus de metge que he acabat sent. Finalment vull agrair a tots els meus companys de l'Hospital Clínic. Els dels serveis d'Anatomia Patològica, Immunologia, i Medicina Interna, però sobretot a tots els membres del servei de Dermatologia. Tots ells han sigut companys i mestres a la vegada.

En el meu treball assistencial, docent i de recerca he cultivat diverses especialitats que m'apassionen i que no es limiten al camp de la meua pròpia especialitat, la Dermatologia. Aquestes són l'Anatomia Patològica, la Immunologia, i la Medicina Interna, i per aquest fet he escollit parlar sobre un tema que abraça totes aquestes disciplines com és la Immunofluorescència en el camp de les malalties cutànies.

La realització d'un diagnòstic en Dermatologia es basa en la conjunció d'una sèrie de dades obtingudes a través d'una bona història clínica i una exploració física minuciosa. Molt sovint però hem de recórrer a tècniques diagnòstiques complementàries com són la pràctica d'una biòpsia per a realitzar una confirmació histològica o a la realització de diverses analítiques. A cavall entre la histopatologia convencional i les tècniques de laboratori es troba la immunofluorescència.

HISTORIA DE LA IMMUNOFLUORESCÈNCIA EN L'ESTUDI DE LES MALALTIES CUTÀNIES

La tècnica d'Immunofluorescència directa es va iniciar a mitjans del segle XX. Albert Coons i els seus col·laboradors van ser els primers a aplicar la tècnica per demostrar la presència del pneumococ en teixits infectats.¹ El que es feia inicialment era immunitzar un animal, generalment una cabra, amb una proteïna humana purificada, amb la qual cosa aquell desenvolupava anticossos específics contra la mateixa. Aquests anticossos posteriorment es conjugaven amb diferents fluorocroms que tenien la propietat d'emetre llum al ser excitats per una longitud d'ona apropiada. Per mitjà d'un microscopi especial es podia observar la fluorescència emesa per els complexos antigen-anticòs-fluorocrom *in vivo* en els teixits.

L'aparició d'aquesta tècnica immunològica va ser acollida amb un enorme interès per la comunitat científica perquè des d'un principi es va veure que podia tenir un gran valor tant en aspectes diagnòstics com patològics de les malalties. Com no pot ser d'altra manera, la Dermatologia no es podia quedar al marge d'aquest descobriment i es va beneficiar d'una manera especial d'aquesta tècnica. Raskin al 1961 va ser el primer en aplicar la immunofluorescència directa en el camp de les malalties cutànies en demostrar dipòsits de fluorescència a la dermis papil·lar de pacients amb dermatitis de contacte.² Però indubtablement, la troballa que va permetre a la immunofluorescència assentar-se sòlidament com a mètode diagnòstic va ser la seva aplicació en el lupus eritematós i en les malalties ampul·lars autoimmunes.

Thomas Burnham i col·laboradors al 1963 van ser els primers que van aplicar la tècnica d'immunofluorescència directa per estudiar la presència de dipòsits a la pell de pacients amb lupus eritematós sistèmic i amb lupus eritematós discoide.³ Per això van utilitzar anti-gammaglobulina humana marcada amb fluoresceïna i van observar una banda fluorescent a la unió dermoepidèrmica que traduïa el dipòsit *in vivo* de gammaglobulines en la pell d'aquests pacients. Posteriorment van observar que aquella banda fluorescent apareixia només a la pell de malalts amb lupus i no en altres malalties. Ho van considerar un marcador altament específic i diagnòstic de lupus, i ho van denominar "*Lupus Band Test*" o "*Test de la Banda Lúpica*". La seva presència indicava la presència o no de lupus en el pacient, i quan es tractava de pell sana, la positivitat anava molt a favor de que el pacient tingués un lupus eritematós sistèmic.⁴⁻⁶

En el camp de les malalties ampul·lars autoimmunes els pioners van ser Ernst Beutner i Robert Jordon. L'any 1964 van demostrar per primera vegada, fent servir la tècnica d'immunofluorescència indirecta, que els sèrums de pacients amb pèmfig vulgar contenien anticossos enfront d'una substància a la superfície de les cèl·lules de l'epiteli escamós estratificat. Cap dels sèrums d'individus normals, o de pacients amb altres malalties cutànies semblava contenir aquesta activitat d'anticossos.⁷ Els mateixos autors van demostrar després que els sèrums de pacients amb penfigoide ampul·lar contenen uns anticossos específics contra la membrana basal, just per sota de l'epiteli escamós estratificat.⁸ Estudis posteriors van demostrar els mateixos tipus de dipòsits

in vivo a la pell dels pacients amb immunofluorescència directa.^{9,10}

Una altra fita important en el camp de les malalties ampul·lars va ser el descobriment per Rudi Cormane a l'any 1967 de la presència de dipòsits granulars d'IgA a la membrana basal de la pell de pacients amb dermatitis herpetiforme.¹¹ Aquesta troballa segueix vigent en els nostres dies i segueix sent el *gold standard* del diagnòstic d'aquesta malaltia.

Finalment mencionar que l'any 1981 Helmut Hintner va introduir la tècnica del mapeig de la membrana basal per immunofluorescència fent servir la pell de pacients amb epidermòlisis ampul·lars hereditàries com a substrat.¹² En el moment actual aquesta tècnica ha substituït pràcticament a la microscòpia electrònica en l'estudi inicial d'aquestes malalties genètiques de la pell.^{13,14}

TIPUS D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

La Immunofluorescència és una tècnica de laboratori que permet demostrar la presència d'anticossos, complement i altres proteïnes en els teixits o líquids de l'organisme. En l'estudi de les malalties cutànies es fan servir tres tipus de tècniques d'immunofluorescència: la Immunofluorescència Directa, la Immunofluorescència Indirecta, i el Mapeig de la Membrana Basal per Immunofluorescència.

La tècnica implica sempre la utilització d'anticossos marcats amb un fluorocrom. Els fluorocroms són compostos que contenen electrons que quan són irradiats amb una llum d'una determinada longitud d'ona aconsegueixen un estat energètic més inestable. Al tornar al seu estat fonamental de forma espontània, emeten una llum d'una longitud d'ona més llarga. Per poder fer-los servir de marcadors han de tenir grups químics capaços de formar enllaços covalents amb les proteïnes que es volen marcar i han d'emetre una gran fluorescència en l'espectre visible. El fluorocrom ideal ha de poder-se conjugar de forma senzilla, no alterar l'activitat d'anticòs de la proteïna marcada i produir un conjugat fluorescent estable. A la majoria de les tècniques d'immunofluorescència que he citat abans es fa servir l'isotiocianat de fluoresceïna que produeix un color verd poma característic.

A continuació revisaré la tècnica d'immunofluorescència directa posant l'accent en les seves aplicacions més freqüents en l'estudi de les malalties cutànies. Per raons de brevetat no els hi parlaré avui de les dues al-

tres tècniques que fem servir al nostre laboratori, la Immunofluorescència Indirecta, i el Mapeig de la Membrana Basal per Immunofluorescència, perquè per això necessitaria un altre xerrada.

IMMUNOFLUORESCÈNCIA DIRECTA

La immunofluorescència directa és un procediment d'un sol pas en que es demostra la presència d'anticossos o altres proteïnes a les biòpsies de pell o de mucoses en diferents condicions dermatològiques.^{15,16}

Les biòpsies s'obtenen mitjançant un *punch* de 3-4 mm. Per obtenir un màxim rendiment, és indispensable prendre la biòpsia d'un lloc adequat. El lloc ideal de biòpsia varia segons la patologia que es vol estudiar. Per les malalties ampul·lars autoimmunes ha de ser de pell perilesional perquè la immunofluorescència pot ser negativa si la biòpsia es pren de la pell lesional perquè els autoanticossos es poden destruir per la inflamació. En el cas de les vasculitis es convenient agafar una mostra d'una lesió purpúrica de menys de 24 hores d'evolució perquè els dipòsits poden patir una degradació en les lesions més evolucionades. En canvi quan la biòpsia es d'una lesió de lupus eritematós o d'un líquen pla el millor es agafar una mostra d'una lesió activa de varies setmanes d'evolució per obtenir els millors resultats.

Una vegada feta la biòpsia, la mostra es congela immediatament en nitrogen líquid o es col·loca en una gasa mullada en sèrum fisiològic per a la posterior congelació al cap de poc temps. En aquells casos en què el laboratori d'immunofluorescència no es trobi proper al centre on hem visitat al pacient col·locarem la biòpsia en un mitjà de transport. El més utilitzat és un mitjà de transport que va descriure el dermatopatòleg Beno Michel a l'any 1973,¹⁷ i que es coneix des d'aleshores com a "Mitjà de Michel". Aquest permet conservar la biòpsia a temperatura ambient durant dies i fins i tot setmanes o mesos.¹⁸ La mostra es pot enviar així per correu al laboratori d'immunofluorescència on serà congelada i processada. Estudis recents han demostrat que si les biòpsies triguen menys de 24 hores en arribar al laboratori el transport en sèrum fisiològic isotònic és el mètode més adequat perquè té resultats superiors a la congelació immediata o al mitjà de Michel.¹⁹ Un altre punt molt important també es evitar sempre la contaminació de la biòpsia amb formalina perquè aquesta pot alterar la mostra i fer que la biòpsia es deteriori i sigui inadequada per l'estudi d'immunofluorescència.²⁰

Per realitzar la immunofluorescència directa s'obtenen talls de 4 a 6 micres de la biòpsia congelada utilitzant un criostat. Després els talls són recoberts amb un anticòs marcat amb fluoresceïna dirigit contra alguna de les classes d'immunoglobulina o la fracció del complement que es vulgui detectar en el teixit. Generalment s'utilitzen anticossos policlonals dirigits contra IgA, IgG, IgM, la fracció C3 del complement i el fibrinogen humans. Finalment, i després de realitzar diversos rentats per eliminar els anticossos conjugats a fluoresceïna que no s'hagin unit al teixit, s'examinen les seccions utilitzant un microscopi de fluorescència. La llum que emet el microscopi és capaç d'activar la fluoresceïna i d'aquesta manera es poden observar els dipòsits d'immunorreagents amb el color verd poma característic. A continuació discutirem les diferents malalties cutànies en les que es pot utilitzar aquesta tècnica en la pràctica dermatològica diària.

1. Malalties ampul·lars intraepidèrmiques (pèmfigs)

a. Pèmfigs Superficials (foliaci, eritematós, seborreic) i Pèmfigs Profunds (vulgar i vegetant)

En aquest grup de pacients s'observen dipòsits d'IgG i de C3 a la superfície dels queratinòcits en el 100% dels pacients amb una malaltia activa (**Figura 1**). Aquest patró és característic però no és específic de cap de les malalties d'aquest grup atès que es pot observar en qualsevol tipus de pèmfig.²¹

b. Pèmfig Paraneoplàstic

A més de les troballes que acabem de descriure que es poden observar en tots els pèmfigs, en els pacients amb pèmfig paraneoplàstic es poden observar també dipòsits granulars o lineals d'immunoglobulines o complement al llarg de la membrana basal similars als que es veuen en un lupus eritematós.²² Aquesta troballa és molt suggestiva però no és totalment específica perquè la veiem de vegades també en alguns pacients amb pèmfig foliaci o eritematós.

c. Pèmfig per IgA

En aquesta forma de pèmfig, la immunofluorescència directa demostra la presència de dipòsits d'IgA a la superfície dels queratinòcits de l'epidermis.²³ En la variant clinicopatològica tipus "dermatosi pustulosa subcòrnia" els dipòsits s'observen al terç superior de l'epidermis mentre que en altres varietats són més difusos.

2. Malalties ampul·lars subepidèrmiques

a. Malalties ampul·lars subepidèrmiques amb dipòsits linears d'IgG

Quan s'examina amb immunofluorescència directa les biòpsies de pell de pemfigoide ampul·lar, pemfigoide de mucoses, pemfigoide gestacional, epidermòlisi ampul·lar adquirida, lupus eritematós ampul·lar, pemfigoide anti-laminina 332, o pemfigoide anti-laminina-gamma-1 les troballes són similars. S'observa la presència de dipòsits linears d'IgG, de complement, o d'IgG i de complement al llarg de la membrana basal que uneix l'epidermis i la dermis.²¹ Cap d'aquestes malalties pot ser diagnosticada si no es demostren aquests dipòsits a la membrana basal. En el cas del pemfigoide ampul·lar es poden veure dipòsits linears d'IgG (**Figura 2**) en un 70% dels casos, i de C3 en gairebé el 100%. L'examen d'immunofluorescència a l'epidermòlisi ampul·lar adquirida sol posar de manifest la presència de dipòsits linears molt intensos d'IgG al llarg de la membrana basal, mentre que els dipòsits de C3 solen ser dèbils o absents. Aquest patró és invers al que observem al pemfigoide ampul·lar i ens permet sospitar aquesta malaltia, però no és un criteri suficient per poder establir un diagnòstic.²⁴

En els últims 10 anys s'ha introduït com a novetat l'anàlisi dels patrons de sinuositat dels dipòsits d'IgG que s'observen a la membrana basal en l'estudi de la immunofluorescència directa per distingir els pemfigoides de l'epidermòlisi ampul·lar adquirida.²⁵ En aquesta anàlisi es fan servir talls més primers i s'examinen les seccions congelades a major augment (de 400 a 600 augments) per veure el patró dels dipòsits a la membrana basal. Aquest patró tenen una correlació amb les troballes de microscòpia immuno-electrònica: en el cas del pemfigoide ampul·lar els dipòsits tenen un patró en "N" que recorda una cinta de confeti, mentre que a l'epidermòlisi ampul·lar adquirida s'observa un patró en "U" que recorda una gespa sense tallar. A pesar de ser molt específics, aquests patrons no sempre són fàcils d'objectivar i en moltes biòpsies no els podem distingir.

b. Malaltia ampul·lar per IgA lineal

Tal com indica el seu nom, la immunofluorescència directa de la malaltia ampul·lar per IgA lineal demostra dipòsits lineals d'IgA al llarg de la membrana basal, amb o sense presència de dipòsits de complement. En alguns casos ens poden trobar també dipòsits d'IgG però són sempre molt més febles que els d'IgA.

c. Dermatitis Herpetiforme

La troballa diagnòstica en els pacients amb una dermatitis herpetiforme és la presència de dipòsits granulars d'IgA a la punta de les papil·les dèrmiques (**Figura 3**). En un petit percentatge dels pacients aquests dipòsits poden ser continus al llarg de tota la unió dermoepidèrmica. Poden existir també dipòsits granulars de C3 o d'altres immunorreactants però són sempre més dèbils i focals. La troballa de dipòsits granulars d'IgA es considera patognomònica d'aquesta malaltia atès que no s'observa en cap de les altres malalties ampul·lars. Quan es vulgui descartar una dermatitis herpetiforme en un pacient la localització més adequada per practicar la biòpsia serà sempre la pell sana perilesional i no la pell sana lluny de les lesions com es preconitzava fa unes dècades, atès que el 100% dels pacients tenen dipòsits en aquesta localització.²⁶

3. Lupus Eritematós

La presència de dipòsits granulars o homogenis d'immunoreactants al llarg de la membrana basal dermoepidèrmica és una característica de totes les formes de lupus eritematós.^{3,27} Tal com he comentat prèviament aquesta troballa va rebre el nom de *Lupus Band Test* quan es va descriure al principi de la dècada dels seixanta. Es parlava d'un *Lupus Band Test* positiu o negatiu en funció de la presència o no d'aquests dipòsits. Només es considera positiva aquesta prova quan s'observen uns dipòsits granulars o homogenis intensos i continus. El més freqüent és que es tracti d'IgM (**Figura 4**), IgG i C3. La presència d'aquests dipòsits s'observa sobretot al lupus eritematós cutani discoide, i al lupus eritematós sistèmic, mentre que només s'observaven dipòsits a la pell sana no exposada als pacients amb lupus eritematós sistèmic. També es poden observar dipòsits a la membrana basal al lupus eritematós subagut i a la malaltia mixta del teixit connectiu, encara que amb menor freqüència. A pesar del que es pensava inicialment, aquests dipòsits no s'han de considerar totalment diagnòstics atès que també es poden observar en altres inflamacions cutànies, i fins i tot a pell fotoexposada de persones sanes.²⁸ De totes maneres a la majoria d'aquests casos els dipòsits solen ser febles i focals, i per tant la presència d'uns dipòsits intensos pot ser molt sospitosa de lupus eritematós. En ocasions podem arribar a observar també en els pacients amb lupus la presència de dipòsits d'IgG als nuclis dels queratinòcits de l'epidermis, el que coneixem amb el nom de *ANA in*

vivo i que tradueix la presència d'anticossos anti-nuclears circulants en el pacient.

4. Vasculitis

Les vasculitis leucocitoclàsiques o de petit vas es poden dividir en dos grans grups en funció de les troballes de la immunofluorescència. Hi ha un primer grup en el que quasi no es troben dipòsits, són les vasculitis paucimmunes, que es corresponen amb les vasculitis per ANCA. Hi ha un segon grup de vasculitis produïdes per immunocomplexes on s'observen dipòsits granulars d'immunoglobulines (IgG ó IgM) i C3 a les parets dels vasos de la dermis superficial. Aquests troballes es veuen sobretot en les fases inicials de la malaltia, i poden no observar-se si es biopsien lesions massa evolucionades.²⁹ Quan es tracta de lesions de més de 24 hores d'evolució pot ser que només es trobin dipòsits de C3 i fibrinogen. Cal tenir en compte, però, que aquestes troballes no són totalment específiques de vasculitis atès que també es poden observar en altres patologies en las que es produeix una alteració de les parets dels vasos.

La púrpura de Schönlein-Henoch és una vasculitis sistèmica en què a més de les lesions de púrpura palpable apareixen artràlgies, símptomes gastrointestinals i glomerulonefritis. La presència de dipòsits granulars d'IgA a la parets dels vasos de la dermis superficial es considera diagnòstica d'aquesta malaltia (**Figura 5**). Poden existir també dipòsits de C3 i de fibrinogen però no d'altres immunoglobulines. Aquestes dades han fet que en l'última conferència de consens de Chapel Hill del 2012 sobre la nomenclatura de les vasculitis es decidís canviar la denominació de púrpura de Schönlein-Henoch per la de "vasculitis per IgA".³⁰

5. Lliquen Pla

En el liquen pla es pot observar la presència de cossos col·loïdes a la dermis superficial en més del 90% dels pacients.³¹ Aquests es tenyeixen sobretot amb IgM, encara que es poden tenyir també amb IgA, IgG, C3 i fibrinogen. La seva presència no és específica atès que es poden observar en totes les dermatosis amb un

patró inflamatori liquenoide com el lupus eritematós, l'eritema polimorf, la dermatomiositis, o les toxicodèrmies liquenoides. De totes maneres en el liquen pla solen ser particularment nombrosos i agrupar-se en cúmuls a la dermis. També es molt freqüent observar la presència de dipòsits linears de fibrinogen al llarg de la unió dermoepidèrmica que característicament són molt gruixuts i tenen un patró esfilagarsat. Aquest patró l'observem sobretot en el liquen pla de mucoses i ens és molt útil per diferenciar-ho d'un pèmfig vulgar o d'un pèmfigoide de mucoses.

PROBLEMES DE LA TÈCNICA D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Tot i que són poc freqüents, poden observar-se resultats falsament positius o falsament negatius. Els falsos negatius solen produir-se per raons tècniques com una presa de mostra inadequada, la contaminació per formalina de la biòpsia, fer servir un mitjà de transport inadequat, procedir amb retard en l'enviament de la mostra al laboratori, o que el laboratori tingui poca experiència i personal poc entrenat. Els falsos positius solen produir-se per un processament inadequat de les mostres, o bé quan es biopsien altres processos inflamatoris. En tots els casos l'experiència del laboratori i del dermatopatòleg que fa l'examen són claus per fer un diagnòstic immunopatològic correcte.

CONCLUSIONS

Les tècniques d'immunofluorescència i les seves variacions tècniques ens han ajudat a comprendre la immunopatologia de diverses malalties cutànies. Es tracta d'un grup de tècniques extremadament útil i que s'ha mantingut com a *gold standar* en el diagnòstic de processos autoimmunes i genètics tot i que han passat més de 50 anys des de la seva introducció en el camp de la Dermatologia. De totes maneres, i com totes les tècniques en Medicina, el seu paper sempre s'ha de complementar amb la clínica, la histopatologia i altres tècniques de laboratori.

Moltes gràcies per la seva atenció.

REFERÈNCIES

- Coons AH, Creech HJ, Jones, R.N., et al. Demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 1942; 45: 159-170.
- Raskin J. Antigen-antibody reaction site in contact dermatitis. *Arch. Dermatol.* 1961; 83:459-461.
- Burnham TK, Neblett TR, Fine O. The application of the fluorescence antibody technique to the investigation of lupus erythematosus and various dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* 1963; 41:451-456.
- Burnham TK, Fine O. The immunofluorescent band test for lupus erythematosus. I. Morphologic variations of the band of localized immunoglobulins at the dermal epidermal junction in lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* 1969; 99:413-420.
- Burnham TK, Fine O, Nerlett TR. Immunofluorescent band test for lupus erythematosus. II. Employing skin lesions. *Arch. Dermatol.* 1970; 102:42-50.
- Burnham TK, Fine O. The immunofluorescent band test for lupus erythematosus. III. Employing clinically normal skin. *Arch. Dermatol.* 1971; 103: 24-32.
- Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964; 117:505-10.
- Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA.* 1967; 200:751-6.
- Cormane RH, Chorzelski T P. "Bound" complement in the epidermis of patients with pemphigus vulgaris. *Dermatologica.* 1967; 134:463-6.
- Jordon RE, Triftshauer CT, Schroeter AL. Direct immunofluorescent studies of pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 1971; 103:486-91.
- Cormane RH. Immunofluorescent studies of the skin in lupus erythematosus and other diseases. *Pathologica Eur* 1967; 2:170-180.
- Hintner H, Stingl G, Schuler G, Fritsch P, Stanley J, Katz S, Wolff K. Immunofluorescence mapping of antigenic determinants within the dermal-epidermal junction in the mechanobullous diseases. *J Invest Dermatol.* 1981; 76:113-8.
- Yasemides E, Walton J, Marr P, Villanueva EV, Murrell DF. A comparative study between transmission electron microscopy and immunofluorescence mapping in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am J Dermatopathol.* 2006; 28:387-94.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 58:931-50.
- Flotte TJ, Margolis RJ, Mihm MC Jr. *Skin. A: Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, eds. Diagnostic Immunopathology, segunda edición.* Raven Press, New York, 1995:123-38.
- Ullman S. Immunofluorescence and diseases of the skin. *Acta Dermatol Venereol (Stockholm)* 1988; Suppl 140:1-31.
- Michel B, Milner Y, David K. Preservation of tissue-fixed immunoglobulins in skin biopsies of patients with lupus erythematosus and bullous diseases--preliminary report. *J Invest Dermatol.* 1972; 59:449-52.
- Vaughan Jones SA, Salas J, McGrath JA, Palmer I, Bhogal GS, Black MM. A retrospective analysis of tissue-fixed immunoreactants from skin biopsies maintained in Michel's medium. *Dermatology* 1994; 189 Suppl 1: 131-2.
- Vodegel RM, de Jong MC, Meijer HJ, Weytingh MB, Pas HH, Jonkman MF. Enhanced diagnostic immunofluorescence using biopsies transported in saline. *BMC Dermatol.* 2004; 4:10.
- Arbesman J1, Grover R, Helm TN, Beutner EH. Can direct immunofluorescence testing still be accurate if performed on biopsy specimens after brief inadvertent immersion in formalin? *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65:106-11.
- Black MM, Bhogal BS, Wilstead E. Immunopathological techniques in the diagnosis of bullous disorders. *Acta Dermatol Venereol (Stockholm)* 1989; 69 (Suppl 151):96-105.
- Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus. *Adv Dermatol* 1997; 12:77-96.
- Wallach D. Intraepidermal IgA pustulosis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:993-1000.
- Smoller BR, Woodley DT. Differences in direct immunofluorescence staining patterns in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 674-8.
- Vodegel RM, Jonkman MF, Pas HH, de Jong MC. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol* 2004; 151:112-8.
- Zone JJ, Meyer LJ, Petersen MJ. Deposition of granular IgA relative to clinical lesions in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol* 1996; 132: 912-8.
- Tuffanelli DL. Cutaneous immunopathology: recent observations. *J Invest Dermatol* 1975; 65:143-153.
- Fabré VC, Lear S, Reichlin M, Hodge SJ, Callen JP. Twenty percent of biopsy specimens from sun-exposed skin of normal young adults demonstrate positive immunofluorescence. *Arch Dermatol* 1991; 127:1006-1011.
- Sais G, Vidaller, Jucglà A, Servitje O, Condom E, Peyrí J. Prognostic factors in leukocytoclastic vasculitis: a clinicopathologic study of 160 patients. *Arch Dermatol* 1998; 134:309-315.
- Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013; 65:1-11.

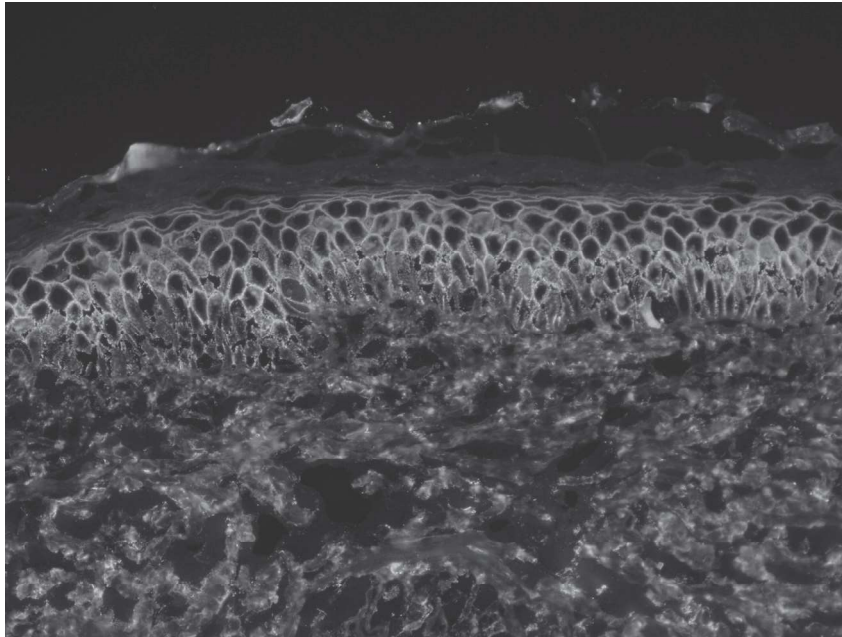


Figura 1. Dipòsits d'IgG als espais intercel·lulars de l'epidermis en un pacient amb pèmfing foliaci (magnitud: 200 augments).

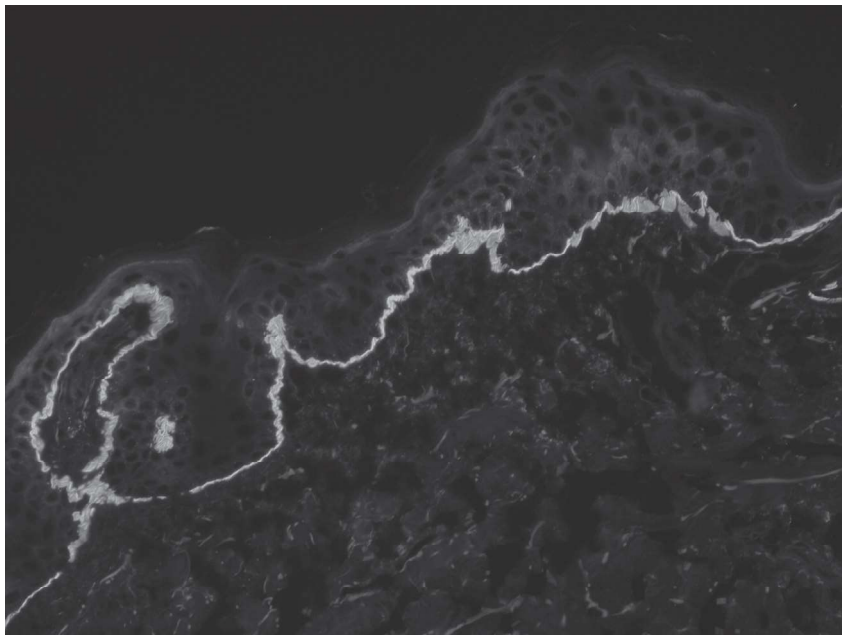


Figura 2. Dipòsits d'IgG al la membrana basal dermoepidèrmica en un pacient amb pemfigoide ampul·lar (magnitud: 200 augments).

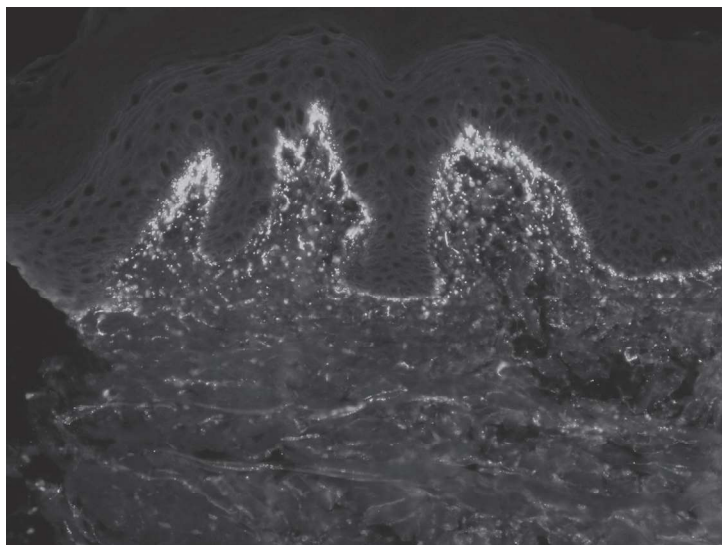


Figura 3. Dipòsits granulars d'IgA localitzats a la punta de les papil·les dèrmiques en un pacient amb dermatitis herpetiforme (magnitud: 200 augments).

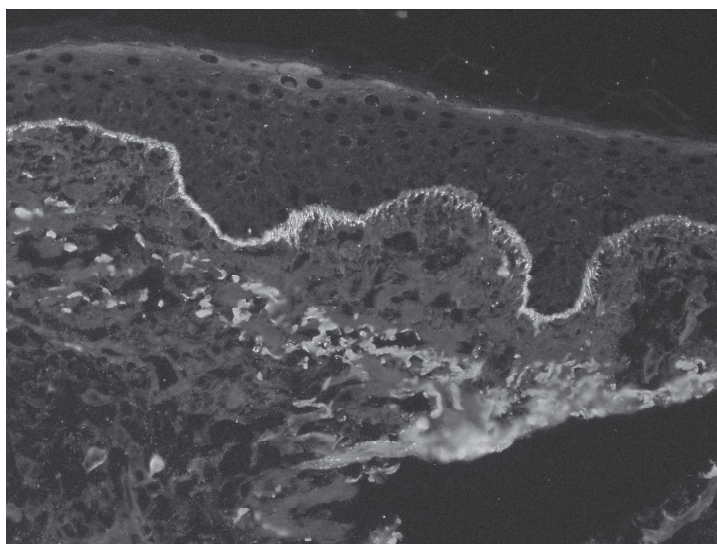


Figura 4. Dipòsits d'IgM continus i homogenis al llarg de la membrana basal en un pacient amb lupus eritematós (magnitud: 200 augments).

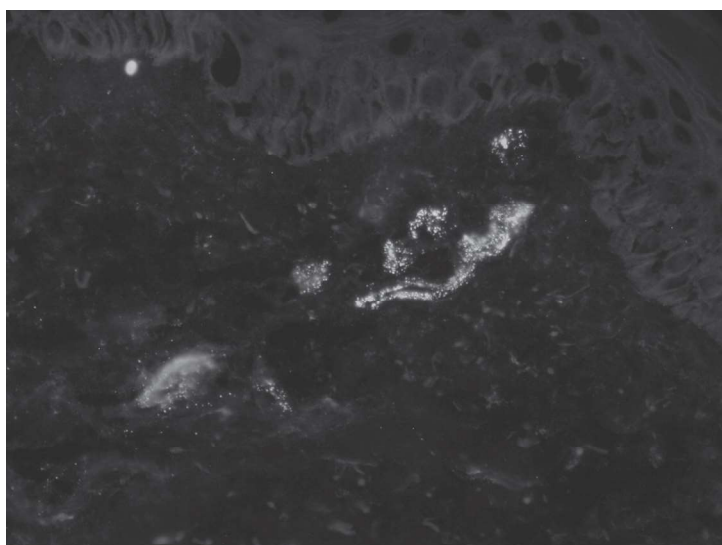


Figura 5. Dipòsits granulars d'IgA a la paret dels vasos de la dermis superficial en un pacient amb púrpura de Schönlein-Henoch (magnitud: 400 augments).