

**IMMUNOPATOLOGIA DE LES MALALTIES  
AMPULLOSES \***

Comunicació presentada el dia 18 de desembre de 1969 pel doctor

**JOSEP M. DE MORAGAS**

Col·laborador del Servei de Dermatologia de l'Hospital de la Santa Creu  
i de Sant Pau de Barcelona

\* Treball efectuat al «Servei de Dermatologia» (Director accidental, Dr. F. Solduga) de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona.

## INTRODUCCIÓ

Els estudis immunològics de BEUTNER i JORDON<sup>3</sup> (1964) semblen indicar una patogènia autogressiva (autoimmune) per a les lesions ampulloses característiques del pèmfig. El 1967, els mateixos autors troben un mecanisme semblant en el pemfigoide ampullós (LEVER)<sup>5</sup>. Hom visualitza els anticossos trobats en el sèrum dels individus afectats de pèmfig o pemfigoide mitjançant tècniques d'immunofluorescència (IF); apareixen a la substància intercel·lular de l'estrat mucós de Malpighi al pèmfig, o a la membrana basal dermoepidèrmica en la malaltia ampullosa subepidèrmica, pemfigoide. La IF, a més de posseir un extraordinari valor diagnòstic, és emprada per a seguir el curs de la malaltia i controlar els resultats del tractament.

Creiem d'interès de descriure la nostra experiència amb tècniques d'IF en les malalties ampulloses.

## MATERIAL I MÈTODES \*

Devem a COONS<sup>6</sup> l'ús de fluoresceïna per a marcar proteïnes i poder detectar-ne la presència als teixits mitjançant l'ús d'un microscopi dotat de llum ultraviolada. Des del 1958, el mètode ha estat àmpliament emprat i ha demostrat la seva especificitat i la seva sensibilitat. No obstant això, pateix de l'inconvenient de la manca de permanència de les preparacions i del fet que la presència de substàncies naturalment fluorescents al teixit fan a vegades difícil la lectura, especialment en teixits rics en teixit elàstic. Dos tipus de tècniques han estat emprats per a l'estudi de les malalties ampulloses.

a) *Immunofluorescència indirecta (IFI)*. Hom empra com a substratum pell humana normal<sup>12</sup>, o esòfag de conill d'índies (fig. 1), de conill o de simi. El substratum, que ha estat convenientment congelat amb ni-

\* Agraïm als Drs. R. K. Winkelmann i R. E. Jordon (Mayo Clinic, Minnesota) llurs ensenyaments que permeteren de posar a punt les tècniques a què ens referim en aquest treball.

trogen líquid a  $-190^{\circ}\text{C}$ ., és conservat en un refrigerador a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A aquesta temperatura pot conservar-se unes dues o tres setmanes com a màxim; si hom el guarda més temps, apareixen fenòmens autolítics que desnaturitzen el substràtum i l'inutilitzen per a l'estudi immunofluorescent. Hom talla el substràtum a un gruix de 4 microns en un criòstat a  $-30^{\circ}\text{C}$ , i el col·loca en un porta. Hom prepara el sèrum del malalt a dilucions progressives amb sèrum fisiològic a partir de la dilució 1/10. El resultat numèric es refereix a la dilució més alta del sèrum que dóna una tinció d'IF positiva.

El substràtum cobert per una o dues gotes de la dilució del sèrum és incubat durant trenta minuts en una cambra humida. Si hi ha anticossos antiepitelials per a la substància intercel·lular o la membrana basal, aquests es fixaran a les zones respectives, per la qual cosa el següent rentat durant quaranta-cinc minuts no aconseguirà de desplaçar-los. A continuació, el substràtum és recobert amb immunoglobulina antihumana marcada amb isotiocianat de fluorescència i incubat a la cambra humida durant quaranta-cinc minuts més. La immunoglobulina pot ésser monovalent, o sigui anti-IgG o anti-IgA o anti-B (1e-1a) (complement-c3), o bé pot ésser global. Si l'anticòs s'ha fixat al seu corresponent antígen, l'antiglobulina marcada amb fluoresceïna en revelarà la presència. El substràtum és rentat per segona vegada durant quaranta-cinc minuts, cobert amb glicerina amortida i examinat al microscopi amb llum ultraviolada (figures 3, 4 i 5. Taula I).

b) *Immunofluorescència directa*. En aquesta tècnica hom empra com a substràtum pell normal o malalta procedent de l'individu afectat. El teixit és incubat amb l'antiglobulina humana marcada amb fluoresceïna durant quaranta-cinc minuts; després, hom procedeix a rentar-ho. Seguint les mateixes normes que en la immunofluorescència indirecta, hom l'examina amb el microscopi, amb llum ultraviolada. Si hi ha anticossos fixats a la substància intercel·lular epidèrmica o a la membrana basal de l'epidermis, apareixerà en una localització o altra la típica fluorescència groc-verdosa de la fluoresceïna (fig. 2).

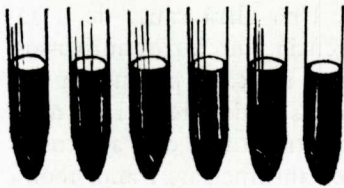
## RESULTATS

### a) *Tècnica indirecta d'immunofluorescència*

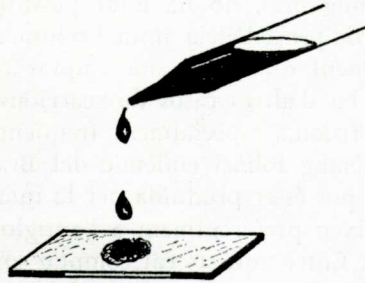
#### *Pèmfig*

Les quatre varietats clíniques de pèmfig han demostrat la presència en sèrum d'anticossos que es fixen específicament a la substància intercel·lular de l'epidermis<sup>5</sup>. La intensitat de la fluorescència és dèbil a nivell

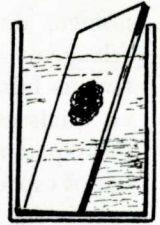
IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA



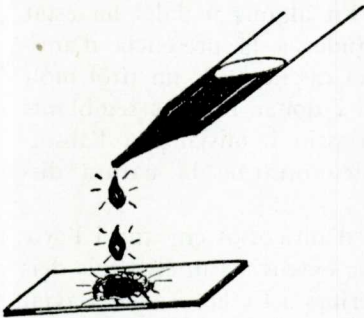
1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320



Substratum epitelial amb una dilució del sèrum



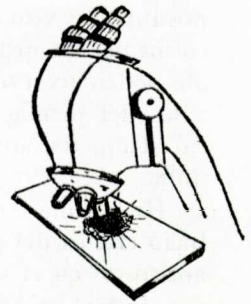
Rentar



Substratum epitelial amb antiglobulina humana marcada



Rentar



Microscopi amb llum ultraviolada

TAULA I. — Fases tècniques de la immunofluorescència indirecta (segons KATZ<sup>12</sup>)

de les cèl·lules basals, es fa intensa a l'estrat espinós i desapareix per sota de la capa granulosa. La valoració de la intensitat de la fluorescència requereix experiència per part de l'observador; hom li dóna arbitràriament una positivitat d'un a quatre. L'anticòs no és específic de l'espècie, puix que existeixen teixits procedents d'animals que serveixen perfectament per a substratum de la reacció. De tota manera, en alguns casos, especialment de pèmfig oral, no ha estat possible d'obtenir respostes positives emprant pell de procedència animal o humana, i hom ha obtingut resultats positius solament quan ha estat emprat com a substratum mucosa oral humana. Hi ha d'altres casos de reaccions negatives falses degudes a fenòmens de prozona, especialment freqüents en malalts afectats de «fogo selvagem» (pèmfig foliaci endèmic del Brasil). Una altra causa de negativitats falses pot ésser produïda per la interferència amb altres anticossos, els quals es fixen preferentment a l'antiglobulina marcada perquè en són més apetents. Entre aquests cal comptar anticossos antinuclears i els anticossos específics d'òrgan. El pèmfig eritematós mostra, a més dels anticossos propis del pèmfig, una taxa elevada d'anticossos antinuclears i amb molta freqüència anticossos antimusculars<sup>8</sup>.

Han estat estudiats milers de malalts amb altres dermatosis amb el fi de descobrir altres afeccions que presentessin anticossos contra la substància intracel·lular epidèrmica similars als del pèmfig. Solament en un vint per cent de malalts afectats de cremades extenses<sup>14</sup> i en dos malalts afectats de la necròlisi tòxica de Lyell<sup>15</sup> ha estat possible de trobar positivitats dèbils semblants a les del pèmfig. En alguns malalts ha estat possible de visualitzar positivitats falses, degudes a la presència d'anticossos per als grups sanguinis A i B, que en el cas de tenir un títol molt alt poden fixar-se a les cèl·lules epidèrmiques i donar imatges semblants a les del pèmfig. Aquests exemples són l'excepció i, mitjançant l'absorció d'aquests anticossos, ha estat possible demostrar-ne la natura distinta.

Hi ha una estreta correlació entre la taxa d'anticossos en sang i l'evolució clínica del pèmfig. En els casos de pèmfig extens actiu, els títols dels anticossos en el sèrum acostumen a ésser superiors a l'1/80, i és més aviat rar de trobar encara positivitats a la dilució de l'1/640. Els anticossos trobats en el pèmfig pertanyen generalment al grup dels IgG, i fixen complement<sup>7</sup>. Mitjançant la medicació corticoidea la taxa d'anticossos en sang davalla paral·lelament a la millora clínica del malalt i constitueix una bona guia per al control dels resultats terapèutics en el malalt. Abans de suspendre la terapèutica cal que la taxa d'anticossos hagi estat reduïda a zero. Un cop suspès el tractament és de bon pronòstic observar la persistència de la negativitat en una sèrie de proves repetides d'IF indirecta. La recidiva clínica de la lesió del pèmfig va precedida de l'aparició dels

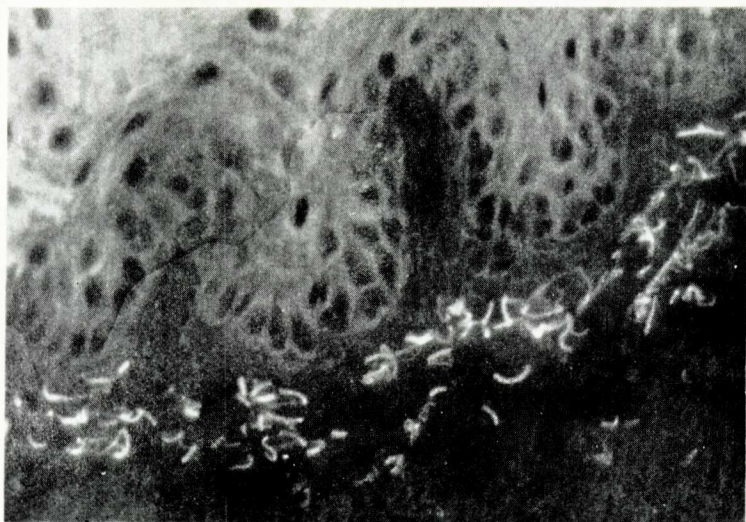


FIG. 1 — Esòfag de conill d'Índies. Control. Les zones clares de l'epidermis corresponen a la fluorescència normal de la ceratina. Les fibres elàstiques es destaquen en la dermis fosca ( $\times 250$ )

FIG. 2. — Immunofluorescència directa positiva en pell biopsiada d'un malalt afectat de pèmfig. Són clarament apreciables els fenòmens d'acantòlisi i la intensa fluorescència de la substància intercel·lular de l'epidermis. L'antigamaglobulina marcada amb fluoresceïna fou emprada a la dilució 1/80 ( $\times 250$ )

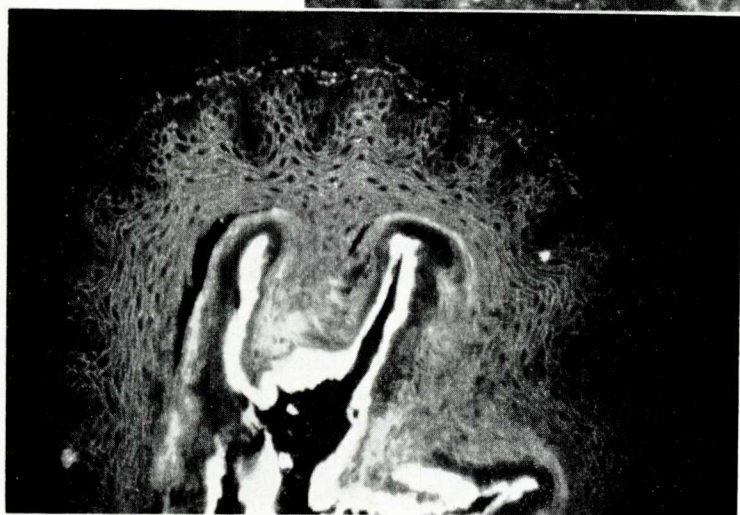
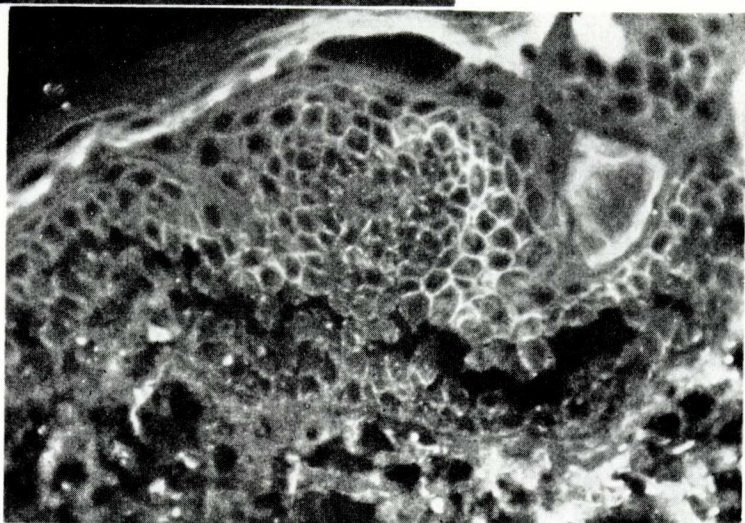


FIG. 3. — Immunofluorescència indirecta positiva emprant com a substratum esòfag de conill d'Índies. El sèrum del malalt afectat de pèmfig fou emprat a la dilució 1/128. Les zones que apareixen blanques al centre corresponen a fluorescència inespecífica de la ceratina. Els espais intercel·lulars de l'epidermis apareixen ben delimitats per la fluorescència específica de la fluoresceïna ( $\times 100$ )

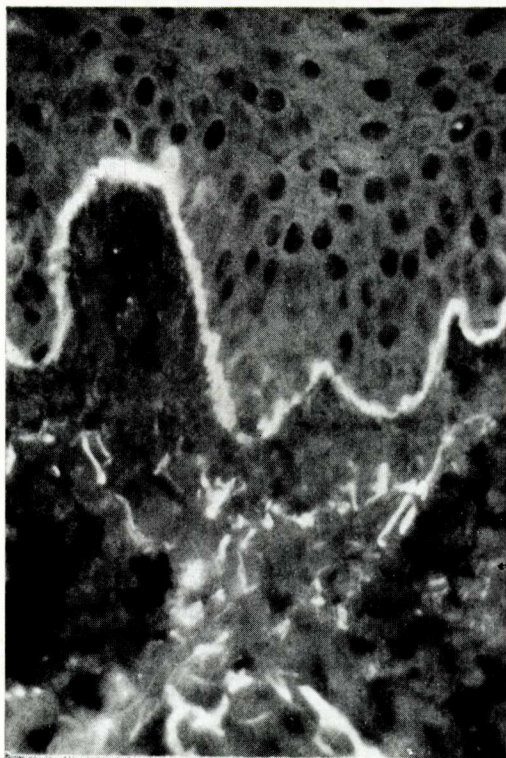


FIG. 4. — Immunofluorescència indirecta positiva en pell normal tractada amb sèrum d'un malalt afectat de pemfigoide a la dilució 1/160. El limit dermoepidèrmic apareix clarament delimitat per la banda fluorescent ( $\times 250$ )

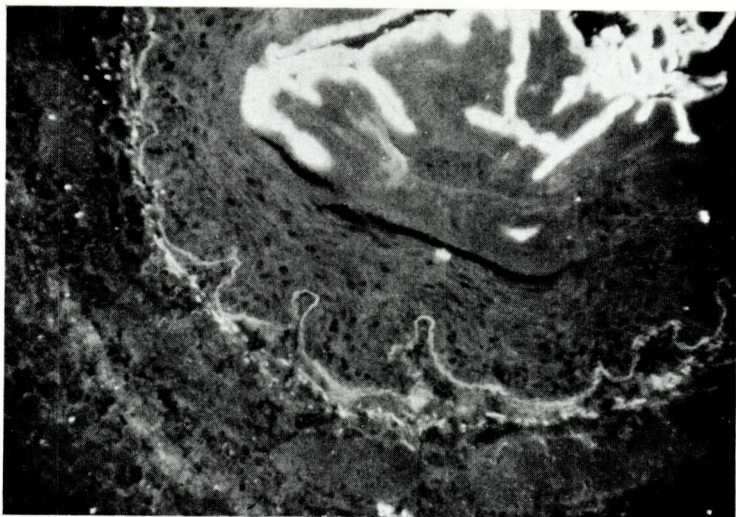


FIG. 5. — Immunofluorescència indirecta positiva, emprant com a substratum esòfag de conill d'Índies i sèrum d'un malalt afectat de pemfigoide a la dilució 1/320 ( $\times 100$ )

anticossos en el sèrum; per això és convenient de practicar determinacions seriades a fi de poder preveure el possible rebrot (taula II).

### *Pemfigoide ampullós*

En el pemfigoide ampullós l'anticòs es fixa en algun antigen present en la membrana dermoepidèrmica. Aquesta apareix com una estreta i densa banda fluorescent molt ben limitada, situada al límit dermoepidèrmic. Això la distingeix de la banda pitjor definida, generalment més ampla, subepidèrmica, present en el lupus eritematós. En el pemfigoide no hi ha una correlació entre l'estat clínic del malalt i la taxa d'anticossos en sèrum. Hi ha malalts que presenten un títol alt d'anticossos sense lesions clíniques, i viceversa; és possible de trobar malalts amb activitat clínica sense anticossos que siguin demostrables pel mètode IF indirecte (aproximadament en un 15 % de casos). En aquests malalts és, malgrat tot, possible de trobar-ne mitjançant el mètode directe d'IF.

La taxa d'anticossos en el pemfigoide pot ésser molt alta: poden ésser obtingudes reaccions positives amb dilucions del sèrum fins a 1/20 000. Més d'un 50 % de sèrums procedents de malalts de pemfigoide contenen anticossos antinuclears. En alguns casos la IF amb aquests anticossos és encara positiva a dilucions a 1/1/80 o més, i suggereix l'associació del pemfigoide amb una malaltia del teixit connectiu. En aquests casos hi ha interferències entre els factors antinuclears amb major apetència per a l'anti-gammaglobulina marcada que no pas els anticossos del pemfigoide.

En ocasions nombroses els anticossos del pemfigoide són fixadors de complement amb positivitats en la IF emprant anti B/1c-1a. A mesura que els casos estudiats augmentin en nombre, serà possible d'aclarir el paper del complement en el desenvolupament de la lesió ampullosa clínica. Desconeixem actualment si els anticossos fixadors de complement comporten una major gravetat en el curs clínic del pemfigoide ampullós.

### b) *Tècnica directa d'immunofluorescència*

El mètode directe d'IF revela la presència d'anticossos fixats en la substància intercel·lular de l'epidermis en les lesions i pell clínicament normal dels malalts afectats de pemfig. En els pacients amb pemfigoide l'anticòs apareix fixat a la membrana basal dermoepidèrmica. És de gran ajuda en el diagnòstic d'aquest darrer procés, en aquells casos en què el mètode indirecte no ha revelat la presència d'anticossos circulants en el sèrum.



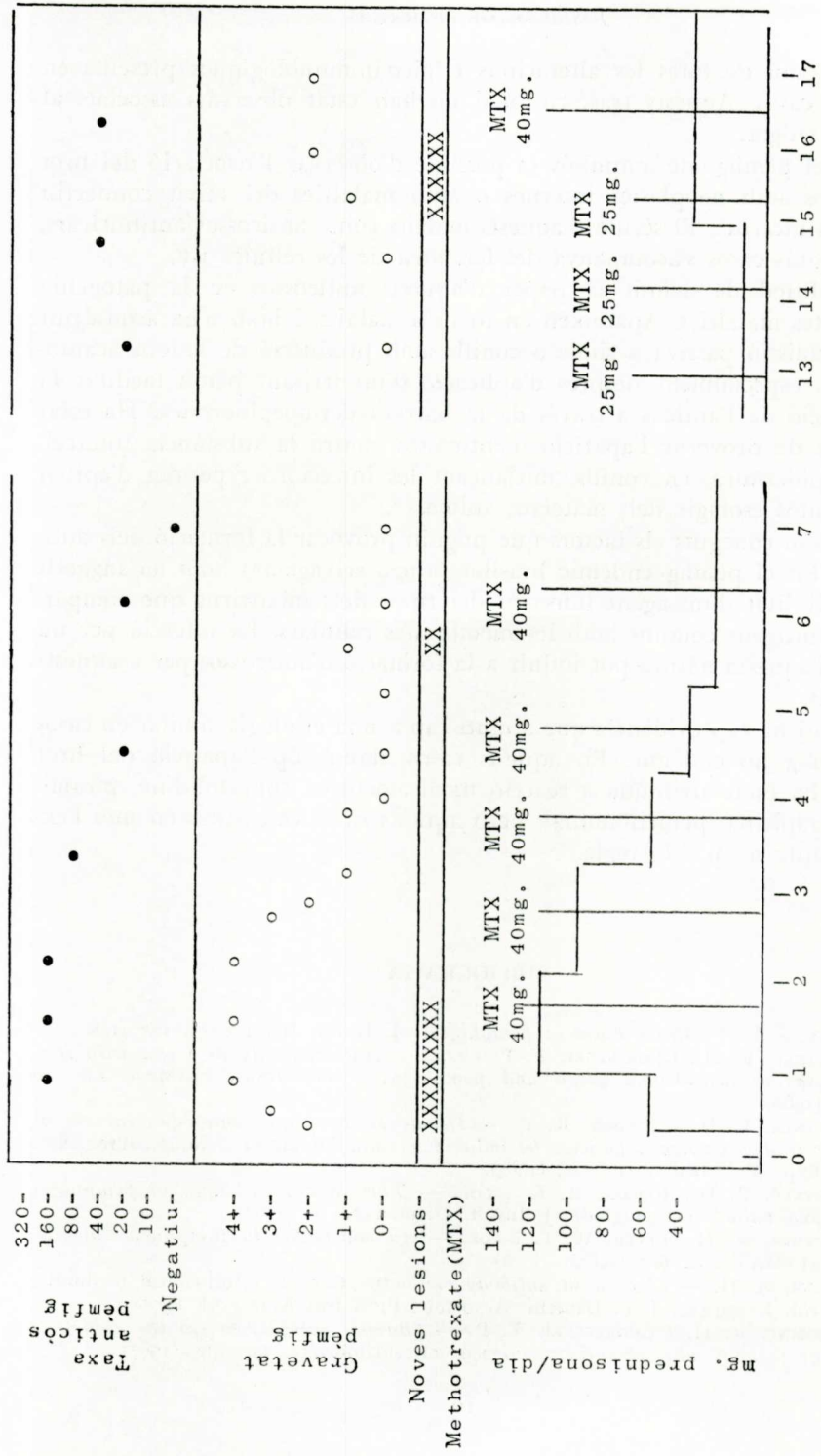
La IF directa té, no obstant això, la seva major utilitat en l'estudi del lupus eritematós, on descobreix l'ampla zona de dipòsit d'immunoglobulina per sota la basal dermoepidèrmica.

#### DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

La immunofluorescència observada en el pèmfig o pemfigoide ampullós sembla ésser immunohistològicament vàlida. És clarament distingible de controls negatius, és compartida per immunoglobulines serològicament reactives, i posseeix un alt grau de sensibilitat i un espectre d'especificitat conegut. Els anticossos presents en el pèmfig reaccionen en l'epidermis de diverses espècies amb un grup d'antígens heterogenis que es relacionen entre ells per llur localització intercel·lular epidèrmica. Bé que generalment l'anticòs pertany al grup de les IgG, és possible de trobar casos en els quals les Ig-A i Ig-M són també presents. Són autoanticossos, és a dir, capaços de reaccionar amb antígens presents en el mateix productor de l'anticòs: la mateixa pell del malalt reacciona amb anticossos continguts en el seu mateix sèrum. L'accés als seus antígens homòlegs sembla solament estar limitat per la manca de vascularització de l'epidermis i pel possible paper de barrera de la basal dermoepidèrmica. No hi són presents en altres malalties ampulloses o afins, tals com la malaltia de Duhring, pemfigoide de membranes mucoses, pemfigoide ampullós infantil, «herpes gestationis», líquen pla i malaltia de Degós. Els anticossos es troben presents en el líquid de la butllofa, en una concentració aproximadament igual a la del sèrum en el pèmfig i aproximadament a la meitat en el pemfigoide <sup>1</sup>.

La presència dels anticossos en sèrum i teixit biopsiat és el criteri més sòlid que posseïm per al diagnòstic i la classificació correcta de les malalties ampulloses. La taxa d'anticossos en el pèmfig serveix de norma per a jutjar l'efectivitat del tractament, guiar la dosificació de corticoides o, i també, antagonistes de l'àcid fòlic i per a establir el pronòstic un cop desapareguda la simptomatologia clínica. Aquesta correlació entre taxa d'anticossos i evolució clínica no es presenta en el pemfigoide ampullós.

El pèmfig eritematós apareix en els estudis amb IF amb unes característiques que el diferencien de les altres formes de pèmfig. Posseix els mateixos anticossos intercel·lulars, però, a més, té una taxa elevada d'anticossos antinuclears i antimusculars i dipòsits en banda d'immunoglobulines per sota la basal dermoepidèrmica en el lupus eritematós. Hi ha casos de pèmfig eritematós, associats a timona, miastènia greu, hipersensibilitat a la llum, anticossos antinuclears i antimusculars <sup>2</sup>. Aquestes concomitàncies parlen a favor d'un trastorn autoimmunitari com a denomi-



Setmanes

TAULA II. — Correlació terapèutic-clínic-serològica en una malalta de 38 anys afectada de pèmfis foliàci. Gravetat 4+ significa una extensió universal de les lesions. O+ significa sense lesions actives

nador comú de totes les alteracions clínico-immunològiques presents en aquests casos. Aquests trastorns mai no han estat observats associats al pèmfing vulgar.

En el pèmfing ampullós és possible d'observar l'associació del brot ampullós amb neoplàsies internes o amb malalties del teixit connectiu o colitis ulcerosa. El sèrum d'aquests malalts conté anticossos antinuclears, i en alguns casos s'acompanya del fenomen de les cèl·lules LE.

És difícil de definir el paper d'aquests anticossos en la patogènia d'aquestes malalties. Apareixen en tots els malalts, i hom n'ha aconseguit la transmissió passiva a simis o conills amb producció de lesions acantolítiques, especialment després d'aplicació d'un irritant per a facilitar la penetració de l'anticòs a través de la barrera dermoepidèrmica. Ha estat possible de provocar l'aparició d'anticossos contra la substància intercel·lular epidèrmica, en conills, mitjançant les injeccions repetides d'epiteli pavimentós esofàgic dels mateixos animals<sup>9</sup>.

No són coneguts els factors que puguin provocar la formació dels anticossos. En el pèmfing endèmic brasiler («fogo selvagem») hom ha suggerit la possibilitat d'un agent infecció del tipus dels mixovirus que comparteixen antígens comuns amb les membranes cel·lulars. La infecció per un agent d'aquesta natura pot induir a la formació d'anticossos per a aquests antígens.

No hi ha cap evidència que apunti cap a una etiologia similar en casos de pèmfing no endèmic. En aquests casos algun cop l'aparició del brot inicial ha estat atribuïda a reacció medicamentosa (butazolidina, piramidon, irgapirina, penicil·lina), però aquests casos constitueixen més l'excepció que no pas la regla.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BEAN, S. F. — *Blister Fluid in pemphigus*. «J. Invest. Derm.», 53: 187 (1969).
2. BEUTNER, E. H., CHORZELSKI, T. P. i COL. — *Autoimmunity in a case with concurrent myasthenia gravis and pemphigus erythematosus*. «JAMA», 203: 10 (1968).
3. BEUTNER, E. H. i JORDON, R. E. — *Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining*. «Proc. Soc. Exp. Biol. Med.», 117: 505 (1964).
4. BEUTNER, E. H., JORDON, R. E. i COL. — *The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid*. «J. Invest. Derm.», 51: 64 (1968).
5. BEUTNER, R. H., LEVER, W. F. i COL. — *Autoantibodies to pemphigus vulgaris*. «JAMA», 192: 682 (1965).
6. COONS, A. H. — *Fluorescent antibody methods*. «General cytochemical methods», vol. I, 399-422. J. F. Danielli. Academic. Press Inc. New York 1958.
7. CORMANE, R. H. i CHORZELSKI, T. P. — *"Bound" complement in the epidermis of patients with pemphigus vulgaris*. «Dermatologia», 134: 463 (1967).

8. CHORZELSKI, T. P., JABLONSKA, S. i BLASZCZYK, M. — *Immunopathologic investigation in the Senear-Usher Syndrome. Coexistence of pemphigus with lupus erythematosus.* «Brit. J. Derm.» (en premsa).
9. GROB, P. J. i INDERBITZIN, T. M. — *Experimental production in rabbits of anti-epithelial autoantibodies.* «J. Invest. Derm.», 49: 637 (1967).
10. INDERBITZIN, T. M. i GROB, P. J. — *Destruction of epithelial cells "in vivo" by anti-epithelial autoantibodies.* «J. Invest. Derm.», 49: 642 (1967).
11. JORDON, R. E., BEUTNER, E. H. i COL. — *Basement zone antibodies in bullous pemphigoid.* «JAMA», 200: 751 (1967).
12. KATZ, S. I., HALPRIN, K. M. i COL. — *The use of human skin for the detection of anti-epithelial autoantibodies.* «J. Invest. Derm.», 53: 390 (1969).
13. LEVER, W. F. — *Pemphigus.* «Medicine», 32: 1 (1953).
14. THIVOLET, J. i BEYRIN, A. J. — *Recherche par immunofluorescence d'autoanticorps sériques vis-à-vis des constituents de l'épiderme chez les brûlés.* «Experientia», 24: 945 (1968).
15. THIVOLET, J. — «Bull. Soc. Franç. Derm.», 75: 639 (1968).