

11281

7

207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

PLACAS Y PAPULAS URTICARIALES PRURIGINOSAS DE LA GESTACION

Estudio sobre su fisiopatogenia

T E S I S
Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS

p r e s e n t a
EDITH GARCIA GONZALEZ

TUTOR DE TESIS: DR. JULIO GRANADOS
ASESORES DE TESIS: DRA. INGEBORG BECKER
DR. SAMUEL KARCHMER



México, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

257601



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PLACAS Y PAPULAS URTICARIALES PRURIGINOSAS DE LA GESTACIÓN
Estudio sobre su fisiopatogenia.

Resumen de tesis para obtener el grado de Doctor

MC Edith García González

Instituto Nacional de Perinatología (INPer)

Preguntas a contestar: ¿La dermatosis de la gestación llamada placas y pápulas urticariales pruriginosas de la gestación (PPUPG) es la dermatosis gestacional más frecuente en el INPer?; ¿cuáles son las células participantes en su fisiopatogenia?; ¿existe un haplotipo determinado para las pacientes de PPUPG Mexicanas?; ¿en verdad solamente se presenta en primigestas?.

Hipótesis: la dermatosis gestacional PPUPG es el más frecuente entre Mexicanas. En este padecimiento las células participantes más importantes son los mastocitos dependientes también de la participación de las células CD4+. No hay un haplotipo determinado para este padecimiento entre Mexicanas y solamente se presenta entre primigestas.

Diseño del estudio: descripciones clínicas en base a una serie de casos de PPUPG entre Mexicanas, prospectivo a 2 años.

Sitio del estudio: INPer, Inst. Nal. de Nutrición, UNAM, Univ. de Emory.

Datos de las pacientes: muestra voluntaria de 16 pacientes gesta I y 7 multigestas, Mexicanas, en el 3er trimestre gestacional. Los controles fueron 152 gestantes Mexicanas (en los 3 trimestres) y 26 no gestantes. Criterios de inclusión: tener una dermatosis generalizada con placas urticariales, pruriginosa, sin tratamiento y que se presente en el 3er trimestre gestacional y que por primera vez se haya presentado esta dermatosis.

Metodología: previo consentimiento de las pacientes por escrito se tomaron biopsias de piel sana y afectada para estudios de inmunofluorescencia directa, y detección de depósitos de IgA, IgG, IgM, C3 y avidina fluoresceinada para búsqueda de mastocitos. También en biopsias de piel y con técnicas de inmunoperoxidasas se buscó la presencia de células CD4+ y CD8+ en piel. Al mismo tiempo en sangre periférica de las pacientes y de los controles se realizaron mediciones de CD4+, CD8+ y NK+ con citometría de flujo. También en suero de las pacientes se hizo detección de IgE sérica con inmunodifusión radial. La tipificación de HLA clase I, II y III se realizó en linfocitos de sangre periférica con la técnica de microlinfocitotoxicidad. La tipificación molecular de los alelos DRB y DQB fue realizada con técnicas de PCR.

Métodos de evaluación y resultados: para análisis estadístico se usó F de Fisher y t de Student, en todos los casos se tomó un índice de confianza del 95%. El PPUPG es la dermatosis gestacional más frecuente en el INPer, con una frecuencia de 1:200

gestaciones. En la piel afectada encontramos un predominio de células CD4+ (60%) y 20% en piel sana y abundantes mastocitos con IgE sérica normal en todas las pacientes. Ausencia de depósitos inmunes en piel normal y afectada. Pacientes con PPUPG tuvieron CD4+ periféricas 37% (sd 7.96) (controles 39%, sd 6.8); CD8+ 29% sd 6.7 (controles 29%, sd 6.2). Las pacientes de PPUPG tuvieron 30% haplotipo HLA-DR4 y 100% DQ α 03, no diferentes de los controles Mexicanos. La mayor parte de las pacientes con PPUPG fueron primigestas pero 7 fueron multigestas, característicamente ellas tuvieron abortos en sus primeras gestas y en gestaciones de diferente pareja desarrollaron PPUPG.

Conclusiones: el PPUPG es la dermatosis urticarial más frecuente del final de la gestación, con participación de células CD4+ y mastocitos, células que a través de interleucinas son interdependientes. Los valores de CD4+ periféricos resultaron tener valores normales y por consiguiente no reflejan lo que sucede en piel. Esta dermatosis gestacional no depende de IgE como otras urticarias ya que los valores séricos fueron normales. Con respecto a los haplotipos clase I y II concluimos que más que ser un haplotipo específico en el PPUPG éste depende de la combinación de ciertos haplotipos materno/paternos. Esta serie representa el primer grupo de Mexicanas estudiadas con PPUPG desde el punto de vista fisiopatogénico. La diferencia más sobresaliente fue que en esta serie encontramos mayor porcentaje de multigestas en comparación con series anglosajonas. A su vez este estudio abre mayor conocimientos sobre los mecanismos inmunes de la gestación.

**PLACAS Y PAPULAS URTICARIALES PRURIGINOSAS
DE LA GESTACIÓN**

Estudio sobre su fisiopatogenia.

Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias Biomédicas

M.C. Edith García González

Tutor de tesis: Dr. Julio Granados

Asesores de tesis: Dra. Ingeborg Becker

Dr. Samuel Karchmer

Alumno: M.C. Edith García González, Instituto Nacional de Perinatología

Tutor de tesis: Dr. Julio Granados, Instituto Nacional de la Nutrición

Asesores de tesis: Dra. Ingeborg Becker, Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Samuel Karchmer, Instituto Nacional de Perinatología

Este trabajo fue realizado en su mayor parte en el Area de Inmuno-Dermatología,
Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México.

Indice General

+ Publicaciones originales	pag. 5
+ Resumen	pag. 7
* Antecedentes generales	pag. 8
+ Dermatosis de la gestación	pag. 8
+ Antecedentes sobre las placas y pápulas urticariales de la gestación (PPUPG)	pag. 9
+ Comparación de PPUPG con el penfigoide gestacional	pag. 10
+ Dermatosis urticariales con influencia hormonal	pag. 11
+ Influencia hormonal sobre los mastocitos	pag. 12
+ Aspectos inmunológicos de la gestación	pag. 13
+ El sistema principal de histocompatibilidad	pag. 14
+ Hipótesis	pag. 15
+ Objetivos	pag. 16
* Material y métodos	pag. 17
+ Pacientes	pag. 17
+ Criterios para diagnóstico de PPUPG y de inclusión para el estudio	pag. 17
+ Biopsias de piel	pag. 18
+ Inmunofluorescencia directa de piel	pag. 18
+ Inmunoperoxidasa	pag. 19
+ Tinciones para mastocitos	pag. 21

+ Tinciones con hematoxilina/eosina	pag.22
+ Determinación sérica de IgE	pag. 22
+ Estudios de citometría de flujo en sangre periférica	pag. 23
+ Tipificación de moléculas clase I y II	pag. 23
+ Tipificación molecular de alelos DRB y DDQB	pag.24
+ Amplificación por reacción de polimerasa en cadena (PCR)	pag. 28
+ Controles	pag. 33
+ Análisis estadístico	pag. 34
+ Resultados	pag. 36
+ Conclusiones	pag. 39
+ Discusión	pag. 42
+ Direcciones futuras	pag. 45
+ Referencias	pag. 46
+ Agradecimientos	pag. 55
+ Figuras, tablas y gráficas	

+ Publicaciones originales

* García González E, Castro J, Montes de Oca D, Zúñiga J, Karchmer S, Granados J. **Class II major histocompatibility complex typing across the ethnic barrier in pemphigoid gestationis. An study in Mexicans.** Enviado a publicación.

* Castro Llamas J, Montes de Oca D, Arroyo E, Karchmer S y García González E. **Estudio comparativo de mediciones de CD4+ y CD8+ en sangre periférica en pacientes sanos Mexicanos y embarazadas en los tres trimestres de la gestación. Un estudio con citometría de flujo.** Enviado a publicación.

* García González E, Andrade MR, Del Barco G, Karchmer KS. **Padecimientos dermatológicos en el Instituto Nacional de Perinatología.** Perinatol y Rep Hum . Rev de Perinatol y Rep Hum 1995; 9(3):156-60.

Capítulos de libros

- * García González E. **Dermatosis propias de la gestación**. En: Temas de Medicina Interna. Vol. II (3), 1995. Editorial Interamericana, McGraw Hill.
- * García González E. **Dermatosis gestacionales**. En: Enciclopedia Francesa de Gineco Obstetricia. Enviado a publicación

Participaciones en congresos

- * Castro Llamas J, Montes de Oca D, Arroyo E, Karchmer S y García González E. **Subpoblaciones linfocitarias durante la gestación en la población Mexicana**
VI Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia. Mazatlán, Sin. 3-8 nov, 1996
- * **aceptado para participar en el Congreso Mundial de Dermatología, Sydney Australia junio, 97.**
- * García González E, Castro J, Montes de Oca D, Zúñiga J, Karchmer S, Granados J. **Class II major histocompatibility complex typing across the ethnic barrier in pemphigoid gestationis. An study in Mexicans.**
*** Segundo lugar, Premio Neutrogena de investigación, marzo 15, 1997.**
Class II major histocompatibility complex typing across the ethnic barrier in pemphigoid gestationis. An study in Mexicans. Enviado a publicación.

mastocitos (MC) en la piel afectada es muy claro no obstante no se encontraron niveles elevados de IgE sérica.

La tipificación de moléculas clase I y II no fueron diferentes de los controles del mismo grupo étnico no mostrando preferencia por un determinado haplotipo.

*** Antecedentes generales**

+ Dermatitis de la gestación

La gestación es un conjunto de cambios metabólicos y fisiológicos que ejercen influencia sobre diferentes órganos. La piel no es la excepción y muestra diferentes modificaciones tales como: a) cambios dermatológicos propios del embarazo, b) influencia sobre dermatosis pre-existentes y c) dermatosis gestacionales (DG), ocurren en alguna etapa del embarazo o en el puerperio ¹. Las DG pueden clasificarse como aquellas bien definidas como las placas y pápulas urticariales pruriginosas de la gestación (PPUPG) y el penfigoide de la gestación o antes mal llamado "herpes gestationis". Las DG mal definidas son: el prúrigo gestationis, dermatosis papular del embarazo, impétigo herpetiforme, prúrigo gravidarum y otras ^{1,2}.

PPUPG es la dermatosis de la gestación más frecuente no solo mundialmente sino también la más frecuentemente vista en el Instituto Nacional de Perinatología (1:200 embarazos), donde representa el 25% de la consulta dermatológica ³.

Antecedentes sobre PPUPG

La dermatosis llamada PPUPG es un padecimiento no autoinmune descrito por primera vez por Lawley TJ y cols. en 1979 ⁴, la describe como un padecimiento inflamatorio que ocurre en el tercer trimestre de la gestación o bien en el puerperio. En un estudio de 25 pacientes con PPUPG se encontró que la semana 36 es la más frecuente para dar inicio al padecimiento y su duración es alrededor de 6 semanas; afectando en un 70% a primigestas. Se considera que los embarazos gemelares presentan con mayor frecuencia esta dermatosis, 7-20% de gemelos en PPUPG comparada con 1.2% en la población general ⁵⁻⁸.

Las lesiones aparecen inicialmente en el abdomen, suelen empezar sobre las estrias y respetan el ombligo, las lesiones se extienden a miembros inferiores, superiores y gluteos, respetando cintura escapular y cara. Clínicamente la lesión primaria es una pápula urticarial que confluyen para formar placas urticariales muy pruriginosas, no encontrándose huellas de rascado (**figura 1**).

Histológicamente el PPUPG no tiene un patrón específico ni diagnóstico. Existe un infiltrado linfocítico perivascular con eosinófilos y edema en dermis papilar, (**figura 2**), espongiosis focal en epidermis y paraqueratosis ^{3,4}. La inmunofluorescencia directa de piel acfeta no muestra depósitos de IgG o de C3 ⁹ (**figura 3 A y 3 B**).

PPUPG no se asocia con riesgos perinatales ^{4,10} pero puede ser un reto diagnóstico y de tratamiento para el médico que no está familiarizado con el padecimiento.

Desde el punto de vista fisiopatogénico el PPUPG no se ha estudiado profundamente. Existen algunos artículos que hablan de posibles mecanismos causales sin haberse

comprobado ninguno de ellos. Dentro de los más conocidos están la teoría del aumento de peso con disgregación de la colágena la cual se cree que actúen antigénicamente. Los embarazos gemelares en otras series se han observado con más frecuencia asociados a PPUPG ^{6,11}.

Publicaciones más recientes hablan de posibles antígenos paternos presentes en el trofoblasto como posible causante de esta DG así como la presencia de haplotipos predisponentes para el desarrollo de PPUPG ¹².

Aspectos hormonales se ha pensado que se asocian con el desarrollo de esta dermatosis, sin embargo mediciones de la fracción beta de la hormona gonadotrópica coriónica humana, estradiol sérico, cortisol y estradiol urinario son normales ¹³.

Comparación de PPUPG con el penfigoide gestacional

Otra de las DG mejor conocidas aunque mucho menos frecuente es el penfigoide de la gestación o antes mal llamado "herpes gestationis". Este es una padecimiento autoinmune con anticuerpos dirigidos contra el antígeno 180-kD del hemidesmosoma de la membrana basal de la piel. Esta reacción ocasiona depósitos de C3 ó IgG (menos frecuentemente) en la unión dermo epidérmica ¹⁴⁻¹⁸. Lo anterior dá como resultado depósitos inmunofluorescentes positivos patognomónicos de penfigoide gestacional encontrados en biopsias de piel afectada a través de inmunofluorescencia directa.

Su incidencia es 1:50,000 embarazos ^{15, 16} y puede ocurrir en el segundo o tercer trimestre de la gestación o en el puerperio inmediato. Es rápidamente progresivo y muy pruriginoso, las lesiones son inicialmente pápulas urticariales para después confluir formando placas, las cuales evolucionan hasta dar vesículas y bulas tensas. Las lesiones

inician en el abdomen, se extienden a miembros inferiores y superiores respetando cara y mucosas. Existe una asociación a complicaciones perinatales como la prematuridad, bajo peso al nacer, oligohidramnios y hasta muerte fetal ¹⁹.

La historia natural del penfigoide gestacional muestra una exacerbación del padecimiento en el puerperio para después ceder en semanas o meses. En gestaciones subsecuentes la dermatosis se presenta de nuevo y en un 25% de mujeres se presenta al tomar anticonceptivos orales ¹⁴.

El penfigoide de la gestación a diferencia del PPUPG sí posee un haplotipo predisponente. El 61% a 80% de los pacientes expresan DR3 y 53% expresan DR4, 43-50% tienen ambos marcadores ^{16, 20}. DR4 está presente en 25% de la población Estadounidense blanca y en solo 8% de la población negra, lo que explicaría la baja incidencia del penfigoide gestacional en la población de color.

En nuestra experiencia con pacientes Mexicanas podemos decir que también los haplotipos DR3 y 4 son constantes en pacientes con esta dermatosis gestacional ²¹; lo cual explicaría la participación de antígenos clase II en la fisiopatogénesis de este padecimiento y por otra parte que estos haplotipos fueron adquiridos por mestisaje.

Dermatosis urticariales con influencia hormonal

La presencia de urticaria con alguna influencia hormonal ha sido descrita previamente en otras dermatosis, como la dermatitis estrogénica con episodios urticariales asociados al periodo menstrual. Mejora bajo la administración de tamoxifen (antagonista del receptor a estrogénos) o con busrelina (análogo de GRH) ^{22, 23}. La

llamada dermatitis autoinmune a la progesterona aumenta durante la fase lutea del ciclo menstrual y también mejora con tamoxifen ²⁴.

Problemas como angioedema, cistitis intersticial ²⁵ y colitis son más frecuentes en mujeres y se asocian a determinada fase del ciclo menstrual. Algo semejante sucede con el asma, alergias y migraña que mejoran con tamoxifén mediante el bloqueo de la liberación de histamina ²⁶.

Influencia hormonal sobre los mastocitos (MC)

Una característica en común en los padecimientos anteriores es la participación de MC en su fisiopatogenia. Los MC tienen receptores hormonales, el estradiol *in vitro* estimula a los MC peritoneales, via substancia P ^{24, 26-30}. Los MC también expresan receptores FCεRI (receptores a IgE CD23b) y receptores a laminina ³¹. La expresión de receptores del complejo principal de histocompatibilidad clase II (bajo la influencia de IL-4 e IFN γ) también están presentes en la superficie de los MC y les permite comportarse como células presentadoras de antígenos ³².

Los MC están influenciados por diferentes citocinas, en animales y humanos la IL-3, IL4 (producida por células CD4+) y el GM-CSF (“granulocyte macrophage colony stimulating factor”) controlan el número y la maduración de los MC ³³. Los MC una vez activados producen diferentes citocinas tales como la IL-3, 4, 5, 6, 13, GM-CSF ³⁴⁻³⁶. Todas las citocinas anteriores perpetúan e inducen su activación estimulando su maduración así como la liberación de histamina ³⁶⁻³⁸.

Los MC a su vez estimulan la migración de eosinófilos vía IL-5³⁸⁻⁴⁰ o vía los RANTES (un grupo de linfocinas recientemente descritas producidos por linfocitos activados⁴¹), este fenómeno puede explicar la presencia de ambas células en algunos infiltrados inflamatorios.

Aspectos inmunológicos de la gestación

Durante el embarazo la respuesta inmune se vé inclinada hacia la producción de anticuerpos y a su vez alejada de la inmunidad celular. La respuesta de anticuerpos está asociada con la inmunidad T_{H2} (subpoblación de las células CD4+) controlada a través de la producción de linfocinas específicas, sugiriendo que ellas predominan en la respuesta inmune materna. Las interleucinas IL-3, 4, 5 y 10 son citocinas T_{H2} y estudios en animales han demostrado que ellas pueden detectarse en sobrenadantes celulares derivados de la unidad feto-placentaria a los largo de los tres trimestres de la gestación⁴²⁴²⁻⁴³. Estas citocinas T_{H2} se producen principalmente en la interfase materno-fetal logrando de esta manera una gestación exitosa. Mientras tanto la IL-10 suprime selectivamente la inmunidad mediada por células dependiente de T_{H1}⁴³. Si la inmunidad T_{H1} domina la gestación no se llevará a cabo exitosamente.

En modelos murinos se sabe que la gestación es posible gracias al reconocimiento del feto por parte de la madre, mecanismo conocido como inmunotropismo y es gracias a este mecanismo que la secreción de citocinas y de factores de crecimiento en la unidad feto-placentaria favorecen el crecimiento placentario y por consiguiente el crecimiento

fetal. Paralelamente existe un bloqueo en la producción de factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma e IL-2 que impedirían una gestación exitosa ⁴⁴.

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH)

El SPH está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis humano (6p21.3) Fig. 4. Hacia la región telomérica se localiza la región clase I del SPH que incluye los loci HLA-A, B y C. Hacia el centrómero está la región clase II, que se subdivide en cuatro subregiones (DP, D0/DZ, DQ y DR). Dentro de la región de clase II se incluyen los determinantes HLA-Dw.

Entre las regiones clase I y clase II, está la región clase III, cuyos genes codifican para los componentes C2, factor B, C4A y C4B. ^{45, 46}

Los genes clase I, II y III se heredan de manera mendeliana codominante. Las moléculas clase I se expresan en la membrana de todas las células nucleadas, excepto en neuronas y trofoblastos maduros, difícilmente localizables en los eritrocitos. De los tres loci de clase I clásicos, HLA-A, -B y -C el locus de C es el que menos adecuadamente se expresa.

Las moléculas clase II se expresan en macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células de Langerhans y células dendríticas, en algunos casos solo lo expresan bajo la influencia de ciertas citocinas como el interferón gamma.

Los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno). Una combinación dada de alelos de los loci FB, C2, C4A y C4B

placenta o por células fetales que migran a tejidos maternos. Esta reacción inmune desencadena una respuesta inflamatoria que clínicamente se observan como urticaria. En gestas subsecuentes no existe esta misma reacción antigénica puesto que existe tolerancia por parte de la madre. No existe un marcador del sistema principal de histocompatibilidad para el PPUPG, sino más bien es una combinación de haplotipos paternos y maternos determinados lo que dá como resultado esta dermatosis de la gestación.

Objetivos

1. Estudiar a un grupo de pacientes Mexicanas con PPUPG
2. Tipificar el inmunofenotipo del infiltrado inflamatorio de la piel afectada en comparación con la piel normal en pacientes con PPUPG
3. Tipificar el inmunofenotipo de sangre periférica en pacientes con PPUPG y controles no gestantes y gestantes en los tres diferentes trimestres
4. Buscar historia de atopia de las pacientes a estudiar
5. Determinar niveles séricos de IgE en pacientes y controles
6. Tipificación de moléculas clase I (HLA-A, B y C), clase II (HLA-DR y -DQ) del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) en las pacientes con PPUPG y controles del mismo grupo étnico

Material y métodos

- Pacientes

Estudiamos prospectivamente a un grupo de 23 pacientes con PPUPG vistas en el Instituto Nacional de Perinatología en la Ciudad de México durante dos años (1994-96). Estas pacientes venían de la consulta de Gineco-Obstetricia o bien del Servicio de Urgencias. Su participación fue previa firma de un consentimiento y el diagnóstico se basó en los criterios clínicos y de laboratorio que se describirán a continuación.

- Criterios para diagnóstico de PPUPG y de inclusión para el estudio

Se incluyeron a todas aquellas pacientes que presentaron las siguientes características:

1. Estar embarazadas y encontrarse en el último trimestre de la gestación o estar en el puerperio inmediato
2. Ser o no primigesta
3. Presentar una dermatosis urticarial pruriginosa, de inicio en el abdomen, que afecte o no miembros inferiores y superiores, respetando cara y que sea una dermatosis que nunca haya presentado antes.
4. No haber recibido tratamiento (s) tópico (s) o por vía oral
5. No tener contraindicaciones médicas para su participación
6. Haber realizado un análisis inmunohistopatológico con tinción de hematoxilina/eosina con hallazgos de urticaria tales como: infiltrado inflamatorio perivascular linfocitario y eosinófilos.

7. Inmunofluorescencia directa de piel negativa.
8. Haber formado previamente consentimiento de participación.-

Biopsias de piel

Previa infiltración de 0.3 cc de anestésico local (Xilocaina 2% sin epinefrina, Astra Chemicals, México) intradérmico se procedió a la toma de biopsias con sacabocados desechables de 4 mm (Prestwick Line, SMS Inc., Columbia, MD. EEUU) de piel afectada y piel sana de la misma paciente. Las biopsias fueron divididas para cortes en fresco y para bloques en parafina.

- Inmunofluorescencia directa de piel

- las biopsias en fresco se incluyeron en medio de congelación (Tissue- Tek, Miles Inc., IN. EEUU) en recipientes de papel aluminio y después almacenados en nitrógeno líquido por 8 hr y por tiempos más largos en ultracongelador a -70° C (Bio-Freezer Forma Scientific Inc, OH, EEUU).
- Se hicieron cortes en crióstato de 5 micras de grosor y para colocar los cortes en laminillas (Premiere, Reamex, SA CV, México) prefijadas con clara de huevo (5 ml en 500 ml de buffer de fosfato) las cuales se almacenaron refrigeradas.
- Como control negativo se usó buffer de fosfatos en cortes de piel afectada y piel sana, así como segundos anticuerpos con los mismos substratos.
- Se usaron anticuerpos fluoresceinados conejo contra humano dirigidos contra IgG, IgA, IgM y C3 (The Binding Site, Birminham, RU) diluidos 1:20 en buffer de fosfatos

sobre el tejido problema y hechas por triplicado, se incubaron por 30 minutos en una cámara húmeda, se lavaron en buffer de fosfato 5 minutos.

- Se fijaron con glicerol (Sigma Chemicals, MI, EEUU) y se analizaron con microscopio de epifluorescencia (Axioskop MC-100, Zeiss, Alemania).

*** Inmunoperoxidasa**

La técnica de inmunoperoxidasa se realizó en cortes de 5 micras en fresco de piel incluida en O.C.T. y congelado a -70°C se colocaron sobre laminillas bañadas en POLI-L-LISINA. Previamente fijadas en acetona durante 10 minutos y se refrigeran.

- Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario (CD4+ y CD8+ cabra anti humano) por 30-60 minutos a temperatura ambiente, para después lavarse con buffer de fosfato

- se bloquea la peroxidasa endógena por uno de los siguientes métodos:

a) peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente

- debe prepararse en fresco y al momento

b) ácido peryódico al 0.28% durante 5-10 minutos a temperatura ambiente

guardar en frío y no usar más allá de dos semanas

c) peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol durante 30 minutos

se puede usar para cortes en frío o frotis

- lavar en buffer de fosfato x 2-5 minutos cada uno

- lavar en buffer de fosfato/albúmina (0.1%)/tween 20 (0.05%). Un lavado de 10 minutos

- escurrir el exceso de PBS/A/T y se seca alrededor

- Posteriormente se incubaba en anticuerpo primario (conejo anti humano CD4+, CD8+) diluido en buffer de fosfato, usando como control positivo se usó anticuerpo dirigido contra clase I, dejando toda la noche a 4 °C en cámara húmeda
- Los lavados fueron en buffer de fosfato x 25 minutos c/u y en buffer de fosfato/A/T un lavado 10 minutos
- La incubación con el en anticuerpo secundario fue durante 30-120 minutos a 37°C cuidando de que el anticuerpo no se secase. Se lavó posteriormente en buffer de fosfato x 25 minutos cada vez
- Las incubaciones en complejo avidina-biotina-peroxidasa fueron durante 30-120 minutos a 37°C teniendo cuidado de que no se seque el complejo
- Un lavado en buffer de fosfato x 3-5 minutos cada uno antes de revelar con diaminobencidina o carbazol

NOTA: especificaciones para revelar con diaminobencidina

+ solución sustrato cromógeno para peroxidasa

a) sol. A

tris-maleato 2.423 g

agua destilada 100 cc

b) sol. B

Hcl 37% 0.833 cc

agua destilada aforar a 100 cc

-solución de trabajo

sol. A 5 cc

sol. B 8 cc

agua destilada 7 cc

- solución reveladora

- a 9.9 de la sol. de trabajo, agregar 0.1 cc de peróxido de hidrógeno al 30%

- a 10 cc de la solución de trabajo, agregar 5 mg de diaminobencidina

- A la solución que contiene diaminobencidina se le agrega 0.1 cc de la solución que contiene el peróxido de hidrógeno, inmediatamente antes de usarse. Checando los resultados bajo el microscopio a fin de detectar el cambio de coloración entre 3-10 minutos.

*** Tinciones para MC**

Para la tinción de los MC se usó avidina fluoresceinada pues se ha demostrado que es una tinción altamente específica para MC de dermis, ya que se une a los gránulos del MC⁴⁹ en tejido congelado además de su facilidad técnica para realizarse. Los cortes de piel por congelación sana y afectada fueron teñidas por triplicado con avidina fluoresceinada 1:20 (Sigma Chem, Detroit, MI). Las laminillas se incubaron durante 30 minutos en una cámara húmeda, para después lavarse dos veces con buffer de fosfato para finalmente montarse con glicerol y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioskop MC-100, Zeiss). Se contaron las células fluorescentes localizadas perivascularmente en tres campos diferentes con objetivo 40x, sacando un promedio de los tres campos y comparándolo con los controles respectivos.

+ Tinción con hematoxilina/eosina

Los cortes para parafina se conservaron en formaldehído en solución al 4% (Merck, México) para después incluirse en bloques y teñirse con hematoxilina/eosina con las técnicas convencionales. Las muestras fueron evaluadas por un solo dermatopatólogo con microscopía de luz (Axioskop MC-100, Zeiss).

+ Determinación sérica de IgE

- Las determinaciones se realizaron por dos métodos diferentes y dependiendo del tiempo de incubación se usaron curvas de calibración o tabla de referencia para determinar la concentración de la proteína en mg/L. Tres controles diferentes fueron proporcionados por el fabricante (The Binding Site, Nanorid, IgE humana, Birminham, RU).
- Paralelamente usamos como controles fueron de pacientes con penfigoide de la gestación como controles colocando las muestras de suero problema 1:0 y 1:10 en las placas de agarosa por triplicado y se incubaron en una cámara húmeda temperatura ambiente. Se midió la difusión en un negatoscopio con escala milimétrica y lupa de relojero cuando era necesario. El diámetro se extrapoló a una tabla de referencia y para los periodos de incubación más prolongados (48 y 72 hrs) se usó una curva de calibración.

Estudios de citometría de flujo en sangre periférica

- Se tomó con venopunción hipodérmica (Becton Dickinson, México) 0.5 cc de sangre periférica del pliegue antecubital la cual se conservó con tubos con EDTA (Becton Dickinson, México). A 100 ul de esta muestra se colocaron en tubos de polipropileno (Labsystems, MA, EEUU) para después agregarle 20 ul de anticuerpo fluoresceinado anti CD4+ o con ficoeritrina sin diluir anti CD8+ y anticuerpo contra células NK+ fluoresceinado (Becton Dickinson, San José Cal.). Se incubaron en la obscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después lavarse dos veces con buffer de fosfatos refrigerado y centrifugado por 10 min a 300 x g en centrifuga Beckman GS-6R, EEUU.

Las células lavadas se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml para leerse en un citómetro de flujo o FACScan (Becton Dickinson, San José Cal.) en busca de los porcentajes de subpoblaciones CD4+, CD8+ y células NK.

- El programa usado para la evaluación de los resultados fue Autocomp y Consort 32 (Becton Dickinson, San José Cal.)

- el índice de células CD4+/CD8+ se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{cél. T cooperadores / célula T supresoras índice} = \frac{\% \text{ de CD4+}}{\% \text{ de CD8+}}$$

+ Tipificación de moléculas clase I y II

Por veno punción se tomaron muestras de sangre periférica de pacientes y controles correspondientes, dichas muestras con gradientes de densidad se separaron los linfocitos

⁵⁰ y las células B fueron separadas con el reactivo de Lympho-Kwik (One Lambda, Cal.) .

La tipificación serológica de los antígenos HLA-A, B y C fue realizada en células mononucleares con la técnica de microlinfocitotoxicidad ⁵¹.

La tipificación de los antígenos HLA-DR y DQ se hizo en células B con una técnica similar pero con tiempos de incubación más prolongados ⁵². Las placas de tipificación fueron de C-six Diagnostics, Mequon, Wis., contenían un total de 210 antisueros, 140 para definir especificidades de los loci HLA-A, B y C y 70 para definir 18 especificidades de los loci HLA-DR y DQ.

+ Tipificación molecular de alelos DRB y DDQB

Esta tipificación molecular se hizo usando la técnica de amplificación de DNA por reacción en cadena de polimerasa, seguida de la hibridación del DNA amplificado utilizando sondas específicas para cada uno de los alelos conocidos. Las sondas se marcaron para su detección.

+ material:

- tubos Falcon de 50 cc estériles
- pipetas pasteur
- micropipetas de 20 y 100 ul
- tubos ependorf de 2.5 cc
- bolsas de hibridación
- película de rayos X

- película fotográfica

+ reactivos:

- buffer de fosfatos

- solución de lisis (NH_4Cl 0.155 M + K_2CO_3 0.01M)

- solución RBC (NaCl 10mM + Tris-base 10 mM + EDTA 25 mM)

- buffer Tris-EDTA

- buffer de Tris-Base 0.5 M, pH 8.0

- solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

- proteinasa K (10 mg/ml)

- fenol

- cloroformo

- alcohol etílico absoluto

- iniciadores derecho e izquierdo para las regiones DRB y DQB

- cloruro de magnesio

- deoxinucleótidos (ATP, CTP, GTP y TTP)

- Taq polimerasa

- agarosa al 1%

- bromuro de etidio (10 mg-ml)

- solución de Naranja G (10 ml de Ficoll al 20%, 2 gr de Tris-base y suficiente Naranja G para dar color)

- NaOH 0.5 M

- NaCl 1.5 M

- Tris-base 0.5 M pH 7.4
- terminal transferasa
- CoCl 25 mM
- oligonucleótidos (sondas) en concentración de 10 pmoles/ul
- digoxigenina (ddUTP-Dig) en concentración de 1 nmol/ul
- EDTA 0.2 M pH 8.0
- glicógeno
- LiCl 4 M
- etanol al 70%
- membranas de nylon
- solución de hibridación, SSPE 6X, solución Denhardt 5X, Lauril-sarconine de sodio 0.1%, SDS 0.02%
- SSPE 30X: NaCl 4.5 M, NaH₂P₀₄ 0.3 M, EDTA 30 mM
- solución de Denhardt: PVP y Ficoll 400 al 2%, 2 g de albúmina sérica bovina
- solución de cloruro de tetrametil amonio 5 M (TMAC)
- solución de revelado 1: Ac maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M
- solución de revelado 2: buffer 1 más 0.3% de Tween 20
- solución de revelado 3: solución de bloqueo diluida 1:10 en amortiguador 1
- solución de revelado 4: Tris-Base 0.1M pH 9.5, NaCl 0.1M y Mg
- solución de bloqueo: reactivo de bloqueo al 10% en amortiguador 1
- anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina
- amortiguador de revelado 4: Tris 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1M y MgCl₂ 50 mM

- dioxetano

+ material biológico

- 20 ml de sangre con EDTA

+ técnicas

- extracción del DNA ⁵³

A las muestras de sangre periférica tomada con EDTA en un tubo Falcon de 50 ml se agregan 30 ml de PBS y centrifugan a 2000 rpm durante 10 min. Se tira el sobrenadante y al botón agregarle 50 ml de solución de lisis (AKC), incubar 30 minutos y centrifugar 1500 rpm por 10 minutos.

Se desecha el sobrenadante y se coloca PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos para después desechar el sobrenadante y agregar AKC, agitar y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.

Se desecha el sobrenadante y colocar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos se desecha el sobrenadante y agregar 3 ml de buffer de RBC, 300 ul de SDS al 10% y 100 ul de proteinasa K (10 mg/ml). Incubar la mezcla durante la noche en baño maría a 65-70°C.

Al día siguiente saturar el fenol utilizando Tris-Base 0.5 M pH 8.0 volumen a volumen, sacar los tubos del baño y agregar a cada uno 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos. Separar la fase acuosa y agregarle 2 ml de amortiguador de Tris-EDTA y 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar como en punto anterior. Obtener la fase acuosa y agregarle otros 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar, hasta que la fase acuosa está cristalina, separar la fase acuosa y agregar NaCl

5M (la décima parte del volumen final, de manera que el NaCl quede a 0.5 M en solución)

La mezcla anterior se agita y se agrega etanol absoluto en proporción 1:4 V/V, el DNA precipitado se obtiene en un tubo ependorf de 2.5 ml. Este DNA se lava con etanol absoluto, el cual se descha. El DNA se deja secar ya sea con N₂ ó a temperatura ambiente. Una vez seco, el DNA se hidrata ya sea con Tris-EDTA o con agua destilada y se guarda a -20°C hasta su uso

+ amplificación por reacción de polimerasa en cadena (PCR) ^{54, 55}.- se prepara una mezcla que contiene todo lo necesario para realizar la amplificación:

- agua 1762.5 ul
- buffer de PCR 10X 250 ul
- deoxinucleótido 2mM 250 ul
- iniciador derecho 50.0 ul
- iniciador izquierdo 50 ul,
- agitar bien y ponerlo en hielo
- Taq polimerasa 12.5 ul

Antes de añadir la enzima a la mezcla, colocar 2ul de los DNA en los tubos de PCR.

Añadir 47.5 ul de la mezcla anterior a cada tubo (mezclando DNA y solución) y añadir dos gotas de agua mineral.

Posteriormente los tubos son colocados en el termociclador, el cual se programa con las siguientes condiciones, las cuales fueron estandarizadas en el laboratorio del Departamento de Reumatología, INNSZ

- desnaturalización 1 minuto a 94°C
- anillamiento 1 minuto a 60°C
- extensión 1 minuto 30 segundos a 72°C
- extensión final 1 minuto 30 segundos a 72°C
- extensión final 7 minutos a 72°C
- todo el proceso se realiza durante 30 ciclos

Una vez finalizado el proceso de amplificación, éste es corroborado por medio de un gel se agarosa al 1%. Se mezclan 5 ul de cada muestra con 7 ul de colorante naranja G. Ésta mezcla se corre en el minigel de agarosa a 50 volts durante 30 minutos. Las bandas son observadas en un transiluminador UV y se compara su corrimiento con un marcador de peso molecular conocido.

Finalmente las muestras amplificadas son guardadas para realizar la hibridación.

Los iniciadores usados en el presente trabajo son los específicos para las regiones genéricas DRB, DQB además del específico para la región DRB3 (izquierdo y derecho en ambos casos).

+ marcaje de las sondas

Cada sonda en cantidad de 95 pmoles es mezclada con 4ul de buffer para terminal transferasa, 4 ul de solución de CoCl 25 mM, 1 ul de ddUTP-Dig (1 nmol/ul) y 1.5 unidades de terminal transferasa.

La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos y después se coloca en hielo. Por otro lado se mezcla 1 ul de glicógeno con 200 ul de EDTA 0.2 M pH 8.0 y de esta solución se añaden 2 ul a la mezcla inicial.

El oligonucleótido marcado se precipita con 2.5 ul de LiCl 4 M y 85 ul de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C, mezclar bien y mantener a -70 u 80°C durante 15 minutos y después a -20°C durante 2 hrs o toda la noche.

Centrifugar a 12,000 g durante 20 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante y lavar el paquete con 60 ul de etanol.

Centrifugar a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante y secar el tubo a vacío o al aire.

+ hibridación

Para el tratamiento de las membranas, éstas se cortan en cuadros de 10 cm² y es marcada en cuadros pequeños de 1 cm². La membrana se humedece con agua destilada, posteriormente se coloca en una solución de SSPE 10X durante 15 minutos. Se seca en el horno a 60°C.

Las muestras se colocan en cuadros de 1 cm² se colocan 2 ul del DNA amplificado. La membrana se seca a temperatura ambiente y luego en el horno a 80°C (puede fijarse el

DNA usando un transiluminador UV). Una vez colocado el DNA en la membrana se procede a desnaturalizarlo, colocando la membrana en una solución de NaOH 0.5 M/NaCl 1.5 M por 5 minutos. Después de la desnaturalización, la membrana es neutralizada colocándola en una solución de NaCl 1.5M/Tris-Base 0.5M pH 7.4 por un minuto. Finalmente la membrana se hornea a 80°C y se pone en el transiluminador UV por 3 minutos.

Para la hibridación las membranas que contienen el DNA amplificado, son pre-hibridadas en la solución de hibridación (0.1-0.2 ml/cm²) durante al menos 30 minutos a 42°C en baño maría y usando bolsas de plástico selladas.

Después de lo anterior las membranas son hibridadas en la solución de hibridación que contiene el oligonucleótido marcado con la digoxigenina (2 a 4 pmoles de sonda por cada ml de solución de hibridación). Esta solución también se agrega a 0.1 a 0.2 ml por cm² de membrana. Este proceso se realiza a 42°C durante toda la noche.

Las membranas son posteriormente lavadas 2 veces (5 minutos cada una) con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación utilizando para esto recipientes de plástico adecuados al tamaño de la membrana. Finalmente la membrana se lava con una solución de TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lava 2 veces con esta misma solución durante 15 minutos a 59°C.

La solución de hibridación con el oligonucleótido marcado puede conservarse a -20°C y usarse nuevamente hasta 2 veces más.

+ Revelado por quimioluminiscencia

Después del último lavado con TMAC en el proceso de hibridación, se elimina el exceso de líquido poniendo la membrana sobre un papel filtro unos segundos, sin dejarlos secar

Los lavados siguientes se realizan a temperatura ambiente en agitación y usando recipientes de plástico cubriendo las membranas.

Una vez eliminado el exceso de TMAC las membranas son lavadas en la solución de revelado 2 durante 5 minutos, después lavadas en solución de revelado 3 durante 30 minutos

Incubar en solución 3 conteniendo el anticuerpo anti-digoxigenina en una solución de 1:10000 durante 30 minutos

Lavar la membrana 2 veces durante 15 minutos cada vez con solución de revelado 2 y después de esto equilibrar la membrana durante 5 minutos en solución de revelado 4.

Incubar la membrana durante 5 minutos en la solución de revelado 4 conteniendo el sustrato de la fosfatasa alcalina (AMPPD) en cantidad de 0.1 mg de AMPPD/ml de solución 3 (dilución 1:100).

Eliminar el exceso de AMPPD poniendo la membrana unos segundos en papel filtro (no dejar secar). la solución diluida de AMPPD debe conservarse a 4°C en la oscuridad y reutilizarla varias veces.

Colocar la membrana en una bolsa nueva de hibridación y sellarla, incubar a 37°C durante 15 minutos en baño maría

Finalmente exponer la membrana en una película de rayos X a temperatura ambiente durante 1 a 3 hrs..

+ deshibridación de la membrana

Una misma membrana puede usarse para varias hibridaciones para la cual se requiere un adecuado lavado de la misma

Se incuba la membrana en una solución de NaOH 0.4 M a 42°C durante 20 minutos. Se quita el exceso de NaOH con papel filtro y la membrana se incuba en una solución de Tris-HCl 0.2M pH 8.0, SSPE 0.1X y SDS 0.1% a 42°C durante 20 minutos con agitación constante. La membrana se deja secar a temperatura ambiente y se verifica la ausencia de oligo utilizando el transiluminador UV.

- Controles

Para este estudio incluimos diferentes grupos de controles descritos a continuación para los estudios de citometría de flujo (subpoblaciones celulares). No consideramos conveniente tomar como referencia los valores proporcionados por los fabricantes de los anticuerpos usados para citometría por ser individuos anglosajones y el número de controles es muy bajo. En estudios previos pudimos comprobar que existen diferencias entre individuos sanos de diferentes grupos étnicos ⁴⁸. Por esta razón nuestros controles fueron del mismo grupo racial al de nuestras pacientes, además de que fueron tomadas de diferentes trimestres de la gestación.

+ 26 Mexicanas no embarazadas sanas

+ 45 “ embarazadas sanas en el primer trimestre de la gestación

+ 43	“	“	segundo	“	“
+ 44	“	“	tercer	“	“

Los controles para la biopsias de piel fueron de tomas de piel normal de la misma paciente, por no tener justificación ética el hacerlo de pacientes embarazadas normales.

Para el grupo control del análisis serológico de los antígenos del SPH se incluyeron 100 Mexicanos de 50 familias sanas, todos ellos mestizos con por lo menos tres generaciones nacidas en México.

Los controles positivos para las determinaciones séricas de IgE fueron los facilitados por el fabricante de las placas de agarosa y como controles paralelos tuvimos a pacientes con penfigoide de la gestación por tratarse de otra dermatosis gestacional con diferentes mecanismos fisiopatogénicos.

+ Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó la prueba de F de Fisher para comparar las varianzas de dos poblaciones normales basados en la información contenida en muestras aleatorias independientes de las poblaciones CD4+ y CD8+ así como de células NK. La razón de estas dos varianzas está dada por la fórmula ^{56,57}:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{con } v_1 = n_1 - 1 \text{ y } v_2 = n_2 - 1 \quad \text{grados de libertad}$$

Esta prueba de igualdad de varianzas se llevó a cabo antes de estimar una hipótesis acerca de la diferencia de las medias. Una vez hecho lo anterior se utilizó la prueba t de **Student** para estimar la igualdad de las medias poblacionales. Los estadígrafos de prueba utilizados fueron ^{56, 57}:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{con } n_1 + n_2 - 2 \text{ grados de libertad}$$

para la diferencia de medias $\mu_1 - \mu_2$ con σ_1 y σ_2 desconocidas e iguales y

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

con grados de libertad:

$$\frac{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} - 2}{\frac{s_1^2}{n_1 + 1} + \frac{s_2^2}{n_2 + 1}} - 2$$

Para la diferencia de medias $\mu_1 - \mu_2$ con σ_1 y σ_2 desconocidas y diferentes. En todos los análisis se tomó en consideración un nivel de confianza del 95%.

Resultados

Se estudiaron 23 mujeres con diagnóstico clínico de PPUPG, corroborado con exámenes de laboratorio (histopatología, inmunofluorescencia directa negativa). Estas pacientes se encontraron entre los 16-41 años de edad, fueron vistas entre la semana 26-41 de la gestación y solo dos empezaron en el puerperio inmediato. Dentro de nuestras pacientes 16 fueron primigravidas y 6 fueron gestas subsecuentes pero de diferente pareja, algunas de ellas con historia de embarazos anembrionicos o abortos en sus primeras gestas. Solo una paciente fue gesta 5 con 3 abortos anteriores. **Tabla 1 y 2.**

Padecimientos asociados

Estos no fueron muy frecuentes y entre ellos podemos citar a dos diabéticas, tres con dermatitis atópica y una con hipotiroidismo y otra con preeclampsia. **Tabla 1.**

Biopsias de piel

+ Tinciones con HE

Todas las biopsias de piel teñidas con HE mostraron hallazgos microscópicos consistentes con PPUPG. Debe recordarse que no existe un patrón diagnóstico en este padecimiento, pero los hallazgos fueron uniformes para todas las biopsias. Los más característicos son infiltrado linfocítico superficial perivascular con cantidades variables de eosinófilos. Los cambios epidérmicos fueron variables desde epidermis sin cambios hasta espongiosis moderada y paraqueratosis. El encontrar una interfase focal vacuolar en la unión dermo epidérmica fue poco frecuente. **Figura 2.**

+ Inmunofluorescencia directa de piel

Ninguna de las biopsias de piel afectada y de piel normal en pacientes con PPUPG mostró depósitos de IgG o de C3 en la membrana basal. Los controles positivos fueron pacientes con penfigoide gestacional o pacientes con lupus eritematoso generalizado.

Figura 3 A y 3 B.

+ Tinciones para MC con avidina fluoresceinada

Los cortes por congelación teñidos con avidina fluoresceinada se observaron bajo microscopio de epifluorescencia contando el número de MC fluorescentes alrededor de los vasos en 3 campos con objetivo 40X obteniéndose el promedio. Se compararon contra controles negativos con PBS y como controles positivos pacientes con urticaria. Se compararon piel normal con normal de los casos problema.

Encontramos que el número de MC era mucho mayor en la piel afectada de las pacientes con PPUPG en comparación con piel no afectada, 16 casos mostraron de ++ a ++++ de intensidad, mientras que la piel sana solo 2 casos tuvieron más de ++, figura 5 A y 5 B y tabla 3. Algunos MC son visibles en la piel no afectada como es de esperarse por ser células que se encuentran normalmente en dermis. Cabe mencionar que el agunos casos en la piel afectada observamos pocos MC.

+ Identificación de células CD4+ y CD8+

En cortes por congelación se usaron tinciones con peroxidasa. Los controles positivos fueron biopsias de enfermedad inflamatoria intestinal. Se contaron cien células del

infiltrado inflamatorio alrededor de los vasos en tres campos diferentes. Se contará el número de células positivas para así obtener el porcentaje de positividad, con objetivo 40X en microscopía de luz.

Las células CD4+ dominaron en el infiltrado inflamatorio en la piel afectada de pacientes con PPUPG 60% comparada con un 20% en piel no afectada **Tabla 4 y Figura 6 A y 6 B**. Las células CD8+ mostraron estar presentes en un 10% en la piel normal y en un 20% en la piel afectada. La **Fig. 6 C** ilustra la presencia de linfocitos CD8+ en piel afectada de pacientes con PPUPG, se puede observar que son escasas en el infiltrado inflamatorio.

+ Determinaciones de IgE sérica

La determinación se realizó en placas de agarosa para inmunodifusión con sueros a diferentes diluciones por triplicado. Los sueros usados fueron de las pacientes con PPUPG y 3 de fueron de pacientes con penfigoide de la gestación y los controles positivos los proporcionados por el fabricante.

Ninguna de las pacientes con PPUPG mostró aumento de IgE sérica, dos de las pacientes con penfigoide gestacional sí mostraron elevación de IgE **Gráfica 1**.

+ Determinaciones de porcentajes de CD4+ y CD8+

Con un citómetro de flujo se midieron subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ en cuadrantes y el programa estadístico proporcionó los valores numéricos de los

porcentajes correspondientes **Figura 7**. Con estos valores se obtuvo el índice CD4+/CD8+ con la fórmula mencionada anteriormente.

Todos los valores fueron comparados con los controles correspondientes utilizando la prueba de F de Fisher para la diferencia de varianzas y la prueba t de Student para la diferencia de medias, con un nivel de confianza del 95% para ambas pruebas.

Pacientes con PPUPG tuvieron CD4+ 37.3% (controles 39.9% 1er trimestre; 39.9% 2 trimestre; 35.7% 3er trimestre). Células CD8+ en PPUPG en un 29.09% (controles 29.5% 1er trimestre; 31.2 2 trimestre y 29.2% 3er trimestre). **Tabla 5 y Gráficas 2 y 3**.

+ Tipificación de HLA clase I y II

Como se muestra en la **Tabla 6** el tamiz de las pacientes con PPUPG mostró que el 30% de ellas tuvieron el haplotipo HLA-DR4 y el 100% el DQ α 03 que comparados con los controles del mismo grupo étnico no muestran ser diferentes. El haplotipo HLA-DR4 0407 presente en un 25% de las pacientes estudiadas mostró al compararse con los controles ser un haplotipo muy constante en la población Mexicana.

+ Conclusiones

De una serie de 23 pacientes Mexicanas con PPUPG podemos concluir que:

- las características clínicas coinciden con las ya publicadas, excepto en el hecho de que las series anglosajonas hay de una predilección por embarazos gemelares para desarrollar PPUPG, no fue nuestra experiencia.

Otra diferencia observada con nuestras pacientes y las series anteriores es el hecho de haber encontrado a 6 pacientes no primigestas con PPUPG, otras series no hablan de este tipo de paciente. Es un aspecto muy interesante abre nuevas posibilidades etiopatogénicas por la posible incompatibilidad de ciertos haplotipos materno/paternos que favorecen el desarrollo de PPUPG.

Hay una participación de los MC en esta urticaria de la gestación, habiendo un predominio de estas células en la piel afectada. Algunos otros mostraron disminución de MC suponemos se deba a que estas células estén degranuladas. También se observaron eosinófilos como parte del infiltrado inflamatorio. Las células CD4+ en el infiltrado inflamatorio de la piel afectada mostraron tener un predominio en comparación con las células CD8+.

Los estudios de citometría de flujo mostraron que el porcentaje de células CD4+ en sangre periférica no mostraron ninguna diferencia de los valores de las pacientes con PPUPG en comparación de los controles gestantes y no gestantes. El dominio de las células CD4+ en el infiltrado inflamatorio de la piel afectada no se correlaciona con los resultados de sangre periférica.

Por otra parte las células NK sí mostraron tener valores menores en pacientes PPUPG en comparación con las pacientes gestantes en los tres trimestres. Los valores de NK de pacientes con PPUPG fueron semejantes a los pacientes no gestantes. Este tipo de células no fue estudiado *in situ*, no podríamos concluir cuál es el significado fisiopatogénico de ellas en esta dermatosis gestacional.

Los estudios de citometría de flujo en este trabajo dieron la oportunidad de conocer los valores normales, en pacientes Mexicanas. Valores correspondientes a células CD4+, CD8+ y células NK+ en sangre periférica de controles no gestante y en controles gestantes en los diferentes trimestres de la gestación. Esto es de suma importancia pues se observó que existen diferencias de estos valores en los controles sajones.

Los estudios de haplotipos de las pacientes con PPUPG no mostraron que existe en el grupo de 23 pacientes estudiadas un haplotipo en común, tal y como otros autores lo han mostrado. El haplotipo DR4 presente en el 30% de los casos de PPUPG es el haplotipo más común en la población Mexicana y para mostrar su significado patogénico, si es que tuviese alguno, sería necesario estudiar los subtipos de este haplotipo.

Con respecto a DQ α y DQ β apenas se encuentran caracterizados en la población Mexicana por lo que es difícil concluir su significado en este padecimiento o en otros.

El haplotipo HLA-DR 4 0407 y 0411, que estuvo presente en un 25% de las pacientes con PPUPG se sabe que es un haplotipo muy constante en la población Mexicana.

En conclusión podemos decir que no obstante no hay un haplotipo constante, pero la combinación de ciertos haplotipos pudiera favorecer la presencia de esta dermatosis gestacional. La aseveración anterior la basamos en el hecho de haber encontrado 6 casos de pacientes multigestas que desarrollaron la enfermedad. Como sabemos este un padecimientos de primigestas y las pacientes con gestas múltiples manifestaron la dermatosis en las primeras gestas cuando éstas fueron de parejas diferentes con historia de abortos u óbitos en sus primeras gestaciones de parejas diferentes.

Discusión

La dermatosis de la gestación PPUPG es la más frecuente en la gestación y sus mecanismos fisiopatogénicos son hasta ahora desconocidos. Como se mencionó antes muchas teorías han sido planteado hasta el momento ^{1, 5, 6, 8, 58, 59} aunque no han sido demostradas. Dado que en nuestro grupo de pacientes estudiado solo una de ellas (menos del 1%) tuvo un embarazo gemelar. Consideramos que la teoría del exceso de peso y la distensión no son las la única causa del padecimiento.

La posibilidad de que se trate de un antígeno paterno como desencadenante de PPUPG parece ser una teoría más factible, ya Weiss y cols lo plantearon inicialmente ¹². Estos autores describen a dos parejas de gemelos monozigotos casados con gemelas homocigotas, ambas parejas presentaron PPUPG en sus primeras gestaciones y concluyeron que la combinación de ciertos haplotipos predispone a despertar una reacción materna durante la gestación.

En nuestro grupo seis pacientes con PPUPG no fueron primigestas, sino que presentaron el padecimiento en gestas subsecuentes, curiosamente de diferentes parejas (con una historia de sus primeras gestaciones terminadas en abortos en la mayoría de los casos). -

Sabemos que el embarazo es un modelo natural de aloinjerto donde en un inicio existe un reconocimiento de antígenos paternos (presentes en tejido trofoblástico) por parte de la madre lo que ocasiona producción de citocinas y de factores de crecimiento que favorecen el desarrollo placentario y por consiguiente del feto, según se ha demostrado

en modelos murinos ^{43, 44}. Este reconocimiento inmune por parte de la madre hacia antígenos paternos parece ser dirigido a antígenos clase I ^{60, 61}. Aparentemente células CD8+ maternas responden a antígenos paternos clase I presentes en las células placentarias ⁴⁴.

Modelos murinos han demostrado que este reconocimiento a antígenos placentarios puede dar como consecuencia un aborto en ciertos casos donde existe una combinación determinada entre ciertas especies murinas ^{44, 62}.

En base a los hallazgos encontrados por nosotros y la información de trabajos de otros autores pensamos que esta dermatosis de la gestación es una forma de manifestar un reconocimiento antigénico, hacia antígenos paternos presentes en el feto o en la placenta. Representaría el PPUPG una forma de enfermedad de injerto contra huésped. Creemos que esta respuesta únicamente se presenta cuando hay una cierta combinación de haplotipos materno/paternos y por ello no se presenta en el 100% de los embarazos.

La tipificación de antígenos clase I y II del SPH no mostró ser diferente de los controles Mexicanos, se sabe que HLA-DR4 es muy constante en la población Mexicana, así como lo son los subtipos HLA-DR4 0407 y 0411 en nuestra población ⁴⁹ y no privativos de ningún padecimiento. En lo que se refiere a DQ α y DQ β apenas están siendo caracterizados en México y su significado no se conoce completamente. Nosotros estamos de acuerdo con otros autores ^{1, 12} al decir que no existe un haplotipo determinado asociado a esta dermatosis gestacional.

Por otra parte se sabe que algunas células fetales principalmente linfocitos, células trofoblásticas y eritrocitos nucleados pueden entrar a la circulación materna ^{63, 64}. El

contacto con células fetales y sistema inmune materna potencialmente podría dar lugar a un reconocimiento antigénico que se manifestara como PPUPG. Esta reacción a su vez activara células CD4+ las cuales pueden convertirse en liberadoras de IL-3 ó IL-4 que son capaces de atraer e inducir la maduración de MC y éstos últimos a los eosinófilos ³⁸. ^{39, 41}. Nuestros resultados demuestran que la presencia de MC domina en el infiltrado inflamatorio de la piel afectada junto con la presencia de eosinófilos. Como ya se discutió antes, los MC una vez activados producen IL-5 o RANTES que atraen a eosinófilos ^{38, 39}. ⁴¹. El no encontrar niveles elevados de IgE en sangre periférica, no descarta la posibilidad de que ésta esté presente *in situ* en la piel afectada, ya que para el estímulo de los MC es fundamental la presencia de IgE.

En algunos casos la piel afectada mostró escasos MC y consideramos que se deba a que éstos hayan estado ya degranulados.

El único estudio sobre PPUPG desde el punto de vista inmunológico es de Carli y cols. ⁴⁵ los cuales encontraron que el predominio de células del infiltrado inflamatorio es predominantemente células T activadas (HLA-DR+, CD25+, LFA-1+) presentes en dermis y por células dendríticas CD1a+, CD54+ (ICAM-1) y células de Langerhans epidérmicas CD1a+ en la piel lesionada. En el infiltrado inflamatorio encontraron un predominio de las células CD4+ sobre las CD8+ en la mayoría de las biopsias de piel lesionada en comparación con piel sana de la misma paciente. Nuestros hallazgos se correlacionan con los anteriores en lo que se refiere a células CD4+ encontrando un mayor predominio en la piel afectada.

PPUPG es un modelo natural fascinante desde el punto de vista inmunológico por

parte de la madre hacia posibles antígenos externos. Abre de este modo un panorama de gran interés en conceptos actuales de fertilidad con bases inmunológicas.

Direcciones futuras

Este trabajo deja las bases para contestar nuevas preguntas no solo relacionadas con el PPUPG sino con aspectos inmunológicos de la gestación misma. Las preguntas más concretas a resolver son:

- ¿este grupo de pacientes tienen anticuerpos anti HLA y de ser positiva la respuesta cuál es el papel que juegan en su fisiopatogénesis?
- ¿existe *in situ* IgE o IL-4 ó IL-5 como mediadores de la activación de MC?
- ¿por qué existe aumento de las células de Langherhans en la epidermis de estas pacientes, cuál (es) antígeno las está activando?
- identificación de células fetales en piel a través de la determinación del cromosoma Y con PCR. Esto ayudará a contestar la pregunta si las células fetales pueden ser las desencadenantes de una respuesta inmune materna y por consiguiente desencadenar urticaria en la gestación.

+ Referencias

1. Yancey BK, Lazarova Z. Dermatoses of pregnancy. En: Cutaneous medicine and surgery. vol 1, pp. 365-71. Editors: Arndt, Le Boit, Robinson, Wintroub. 1996 Saunders.
2. García González E. Dermatoses propias de la gestación. En: Temas de Medicina Interna. Vol. II (3), 1995. Editorial Interamericana, McGraw Hill.
3. García González E, Andrade MR, Del Barco G, Karchmer KS. Padecimientos dermatológicos en el Instituto Nacional de Perinatología. Perinatol y Rep Hum . Rev de Perinatol y Rep Hum 1995; 9(3):156-60.
4. Lawley TJ, Hertz KC, Wade TR, Ackerman AB, et al. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. JAMA 1979; 1696-99.
5. Pauwels C, Bucaille-Fleury L, Recanati G. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy: relationship to maternal weight gain and twin or triplet pregnancies (carta). Arch Dermatol 1994; 130:801-2.
6. Cohen LM, Capeless EL, Krusinski PA, et al. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy and its relationship to maternal-fetal weight gain and twin pregnancy. Arch Dermatol 1989; 125: 1534-36.
7. Callen JL, Hanno R. Pruritic urticarial and plaques of pregnancy (PUPPP): A clinicopathologic study. J Am Acad Dermatol 1981; 5:401-5.
8. Alcalay J, Ingber A, David M, et al. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy: A review of 21 cases. J Reprod Med 1987; 32:315-16.

9. Goodall J. Immunofluorescence biopsy for pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy (lett.). *Arch Dermatol* 1990; 126:1517.
10. Alcalay J, Wolf JE. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy: the enigma and the confusion. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20:115.
11. Pauwels C, Bucaille-Fleury L, Recanati G. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy: relationship to maternal weight gain and twin or triplet pregnancies (carta). *Arch Dermatol* 1994; 130:801-2.
12. Weiss R, Hull P. Familial occurrence of pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26:715-7.
13. Alcalay DJ, Ingber A, Kafri B, Segal J et al. Hormonal evaluation and autoimmune background in pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:417-20.
14. Shornick JK. Herpes gestationis. En: *Cutaneous medicine and surgery*. vol 1, pp. 679-84. Editors: Arndt, Le Boit, Robinson, Wintroub. 1996 Saunders.
15. Shornick JK, Bangert JL, Freeman RG, Gillian JN. Herpes gestationis: Clinical and histologic features of twenty-eight cases. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:214-224.
16. Holmes RC, Black MM, Dann J, et al. A comparative study of toxic erythema of pregnancy and herpes gestationis. *Br J Dermatol* 1982; 106:499-510.
17. Kenkins RE, Shornick JK, Black MM. Pemphigoid gestationis. *J Europ Acad Dermatol & Venereol* 1993; 2: 163-73.
18. Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Díaz L. Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen. *J Clin Invest* 1988; 81:2023-26.

19. Merchaoui J, Makhoulouf T, Sfar R, Mokhtar I, Fazaa B, Kamoun MR. Obstetrical prognosis of gestational pemphigoid. Study of a series of 13 cases and review of the literature. *J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris* 1992; 21:963-7.
20. Shornick JK, Stasny P, Gilliam JN. High frequency of histocompatibility antigens HLA-DR3 and DR4 in herpes gestationis. *J Clin Invest* 1981; 68:553-555.
21. García González E, Castro J, Montes de Oca D, Zúñiga J, Karchmer S, Granados J. Class II major histocompatibility complex typing across the ethnic barrier in pemphigoid gestationis. An study in Mexicans. Enviado a publicación.
22. Shelley WB, Shelley ED, Talinin NY, Santoso J. Estrogen dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32:25-31.
23. Vliagoftis H, Dimitriadou V, Boucher W, Rozniecki JJ, Correia Raam S, Theoharides TC. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98:398-409.
24. Herzberg AJ, Strohmeier CR, Cirillo-Hyland VA. Autoimmune progesterone dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32:335-8.
25. Pan X, Cotreau-Bibbo MM, Sant GR, Theoharides TC. Bladder mast cell expression of high affinity oestrogen receptors in patient with interstitial cystitis. *Br J Urol* 1995; 75:154-61.
26. Vliagoftis H, Dimitriadou V, Boucher W, Rozniecki JJ, et al. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98:398-409.

27. Galli SJ. Biology of disease. New insights into "The riddle of the mast cells": Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; 62: 5-33.
28. Galli SJ. New concepts about mast cell. *N Engl J Med* 1993; 328:257-265.
29. Menendez-Pelaea A, Mayo JC, Sainz RM, et al. Development and hormonal regulation of mast cells in the Harderian gland of Syrian hamsters. *Anat Embryol Berl* 1992; 186:91-7.
30. Vauthay LG, Capalbo E, Celeste F, de Bonaparte YP. Mast cells in female mouse lymph nodes. *Brain Behav Immun* 1991; 5:383-7.
31. Thompson HL, Burdelo PD, Metcalfe DD. Regulation of adhesion of mouse bone marrow-derived mast cell to laminin. *J Immunol* 1990; 145:3425-31.
32. Frandji P, Tkaczyk C, Oskeritzian C, Lapeyre J, et al. Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony stimulating factor and downregulation by interferon-gamma. *Cell Immunol* 1995; 163:37-46.
33. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cell as source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 1990; 11(12).
34. Okayama Y, Semper A, Holgate ST and Church MK. Multiple cytokine mRNA expression in human mast cells stimulated via Fc epsilon RI. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:158-9.
35. Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 1995; 181:1373-80.

36. Kaplan AP, Baeza M, Reddigiari S, Kuna P. Histamine-releasing factors. *Int Arch Allergy Apply Immunol* 1991; 148-53.
37. Thompson-Snipes L, Dher V, Bond MW, Mosman TR, Moore KW, et al. Interleukine 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991; 173:507-10.
38. Li L, Elliot JF, Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1994; 153:3967-78.
39. Jaffe JS, Glaum MC, Raible DG, Post TJ, Dimitry E, et al. Human lung mast cell IL-5 gene and protein expression: temporal analysis of upregulation following IgE-mediated activation. *Am J Respr Cell Mol Biol* 1995; 13:665-675.
40. Valent P. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Exp Dermatol* 1995; 255-259.
41. Matoll S, Ackerman E, Vittori E, Marini M. Mast cell chemotactic activity of RANTES. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209:316-21.
42. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat and Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; 151:4562-
43. Wegman TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T_H2 phenomenon?. *Immunol Today* 1993; 14(7):353-6.
44. Tangri S, Wegmann TG, Lin H, Raghupathy R. Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Immunol* 1994; 152:4903-11.

45. Dunham Y, Sargent CA, Trowsdale J, Campell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7237-41.
46. Klein J. Origin of the histocompatibility complex polymorphism the trans-species hypothesis. *Hum Immunol* 1987; 19:155-62
47. Granados J, Vargas-Alarcón G, Oria CV, Andrade F, Melín-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. Relationships of cardiolipin antibodies, antiphospholipid syndrome and HL-DR7 in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus* 1997; 6:57-62.
48. Castro Llamas J, Montes de Oca D, Arroyo E, Karchmer S y García González E. Estudio comparativo de mediciones de CD4+ y CD8+ en sangre periférica en pacientes sanos Mexicanos y embarazadas en los tres trimestres de la gestación. Un estudio con citometría de flujo. Enviado a publicación.
49. Bergstresser PR, Tigelaar RE, Tharp MD. Conjugated avidin identifies cutaneous rodent and human mast cells. *J Invest Dermatol* 1984; 83:214-18.
50. Boyum A. Isolation of leukocytes from human blood: further observations. *Scand J Clin Lab Invest (supl)* 1968; 97:31.
51. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytokins. *Nature* 1964; 204: 998.
52. Bodmer JG, Pickboume P, Richards S. *Ia Serology* En: Bodmer WF, Batchelor JR, Bodmer JG, Festenstein H, Morris PJ, editores: *Histocompatibility testing 1977*, Munksgaards, Copenhagen, Dinamarca 1978, p. 612.

53. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
54. Saiki RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn G, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of B-globin genome sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350.
55. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487.
56. Márquez Cantú MJ. Estimaciones y pruebas de hipótesis. En: *Probabilidad y estadística para Ciencias Químico-Biológicas*, pp 262-322.
57. Mendenhall W, Sheaffer RL, Wackerly DD. Distribuciones muestrales y el teorema del límite central. En: *Estadística matemática con aplicaciones*. Grupo editorial Iberoamérica. Tercera edición 1986, pp 265-291.
58. Yancey KB, Hall RP, Lawley TJ. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10:473-80.
59. Holmes RC. Polymorphic eruption of pregnancy. *Semin Dermatol* 1989; 8:18-22.
60. Raghupathy R, Singh J, Barrington Leigh, Wegmann G. Ontogeny and turnover kinetics of paternal H-2K determinants on the allogeneic placenta. *J Immunol* 1981; 127:2074.
61. Hunt JS, King Jr. CR, Wood GW. Evaluation of human chorionic trophoblast cells and placental macrophages as stimulators of maternal lymphocyte proliferation in vitro. *J Reprod Immunol* 1984; 6:377.

62. Hill JA. Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure. A critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol* 1990; 22:33.
63. Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in maternal circulation. *J Reprod Med* 1992; 37:410-8
64. Chueh J, Golbus MS. The search for fetal cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1991; 19:411-20.
65. Carli P, Tarocchi S, Mello G, Fabbri P. Skin immune system activation in pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy (lett). *Int J Dermatol* 1994; 33:884.

Abreviaturas

DG dermatosis de la gestación

HLA "human leukocyte associated antigen"

MC mastocitos

PPUPG placas y pápulas urticariales pruriginosas de la gestación

SPH sistema principal de histocompatibilidad

PCR "polymerase chain reaction"

Agradecimientos:

Este trabajo no hubiera sido posible sin la gentil e invaluable ayuda de las siguientes personas mencionadas a continuación en orden alfabético. Personas con quienes estoy profundamente agradecida por el cariño, orientación profesional y apoyo que siempre me brindaron:

Dr. Roberto Ahued

Dr. Ramón Alcántara

Dra. Estela Arroyo

Dra. Ingeborg Becker

Dr. Andrés Castell

Dr. Wright Caughman

Biol. Javier Castro

Dr. Ricardo García Cavazos

Ing. Benjamín García Germán

Sra. Virginia García González

Sra. Virginia González de García

Dr. Julio Granados

Dr. Samuel Karchmer

Dr. Thomas J Lawley

Biol. Sue Manos

Dr. Darío Montes de Oca

Dr. Robert Swerlick

Lic. Rodolfo Lara A.

Dr. Kim Yancey

*** y muy especialmente a nuestras pacientes**

Un reconocimiento muy especial a los siguientes servicios en donde se realizó parte de este trabajo:

Departamento de Genética y Area de Inmuno Dermatología,

Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México

Departamento de Dermatología, Universidad de Emory, Atlanta, Ga.

Departamento de Reumatología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,
Ciudad de México

Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México

Servicio: "Janssen en su Consultorio", por su gran apoyo bibliográfico

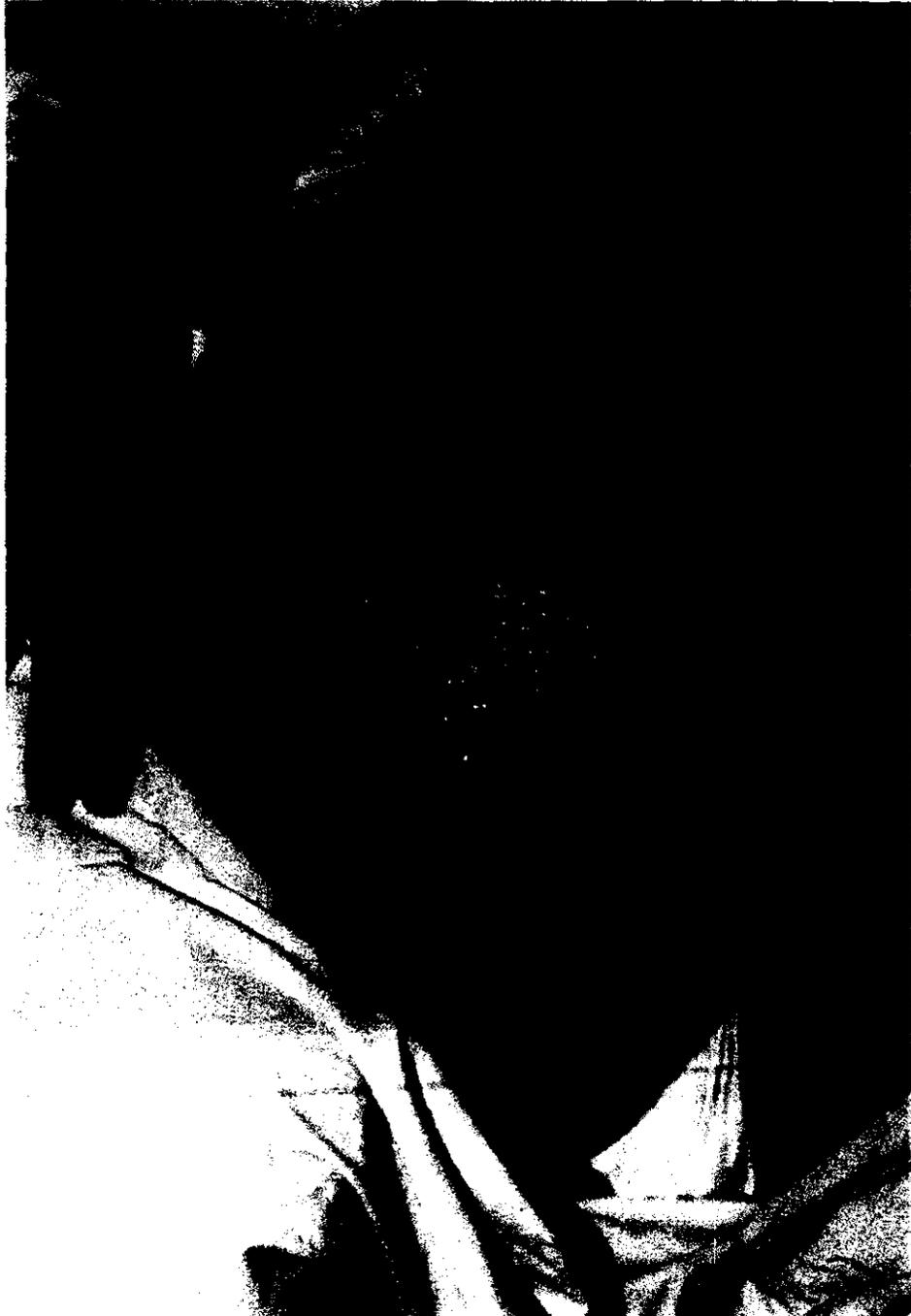


Figura 1. Esta fotografía clínica ilustra la imagen de PPUPG en una paciente en el tercer trimestre de la gestación. Lo característico de esta dermatosis es el inicio de las lesiones sobre las estrias (respetando el ombligo) para después extenderse a miembros inferiores y superiores.

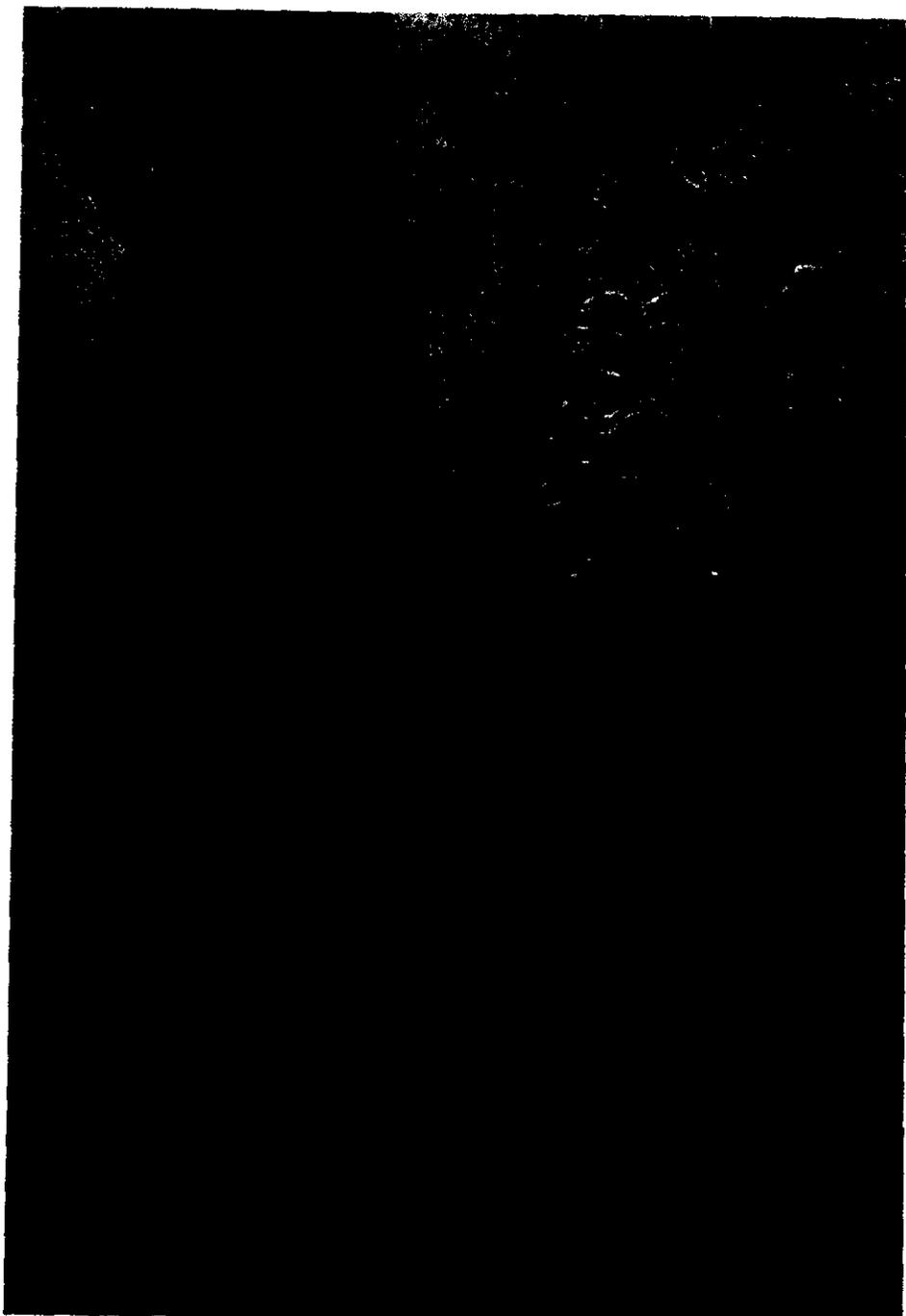


Figura 2. Es una microfotografía de una biopsia teñida con hematoxilina/eosina de piel afectada con PPUPG. La imagen corresponde a una urticaria con infiltrado linfocitario perivascular y eosinófilos.

Figura 3 A



Figura 3 A y 3 B. "A" corresponde a una inmunofluorescencia directa en piel afectada de una paciente con PPUPG, es negativa (sin depósitos inmunes) como es esperable. La figura "B" es un control positivo correspondiente a una paciente con penfigoide de la gestación y depósitos de C3.

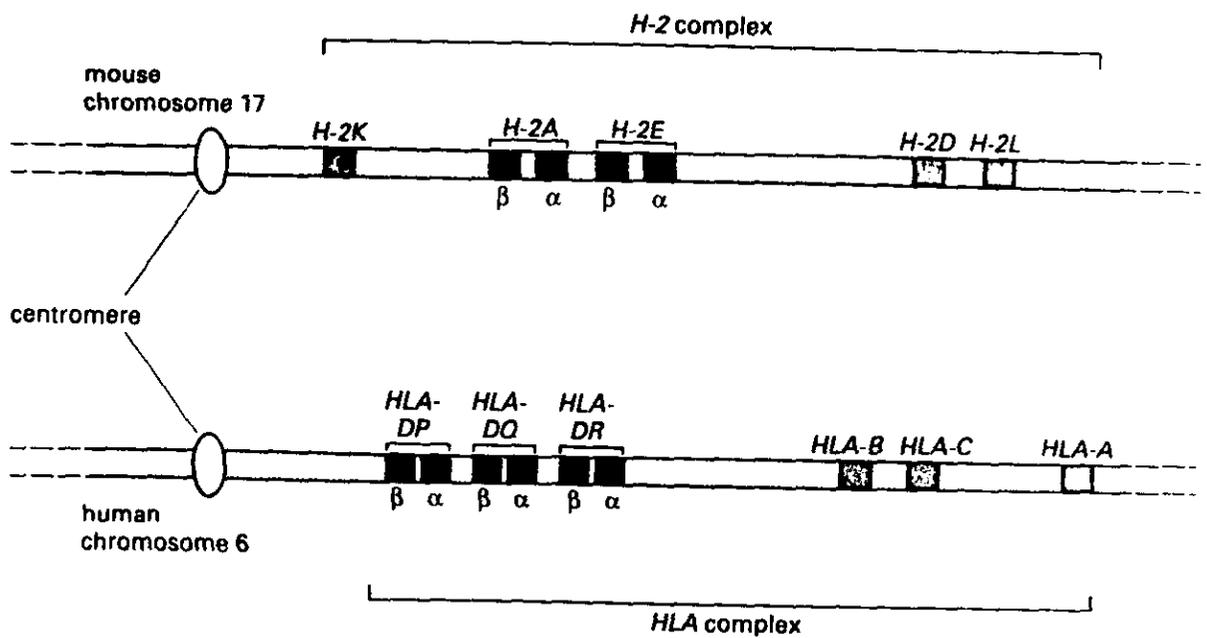


Figura 4. Esta figura representa la localización de los locus genéticos que codifican para la subunidades transmembranales de las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II.

Figura 5 A

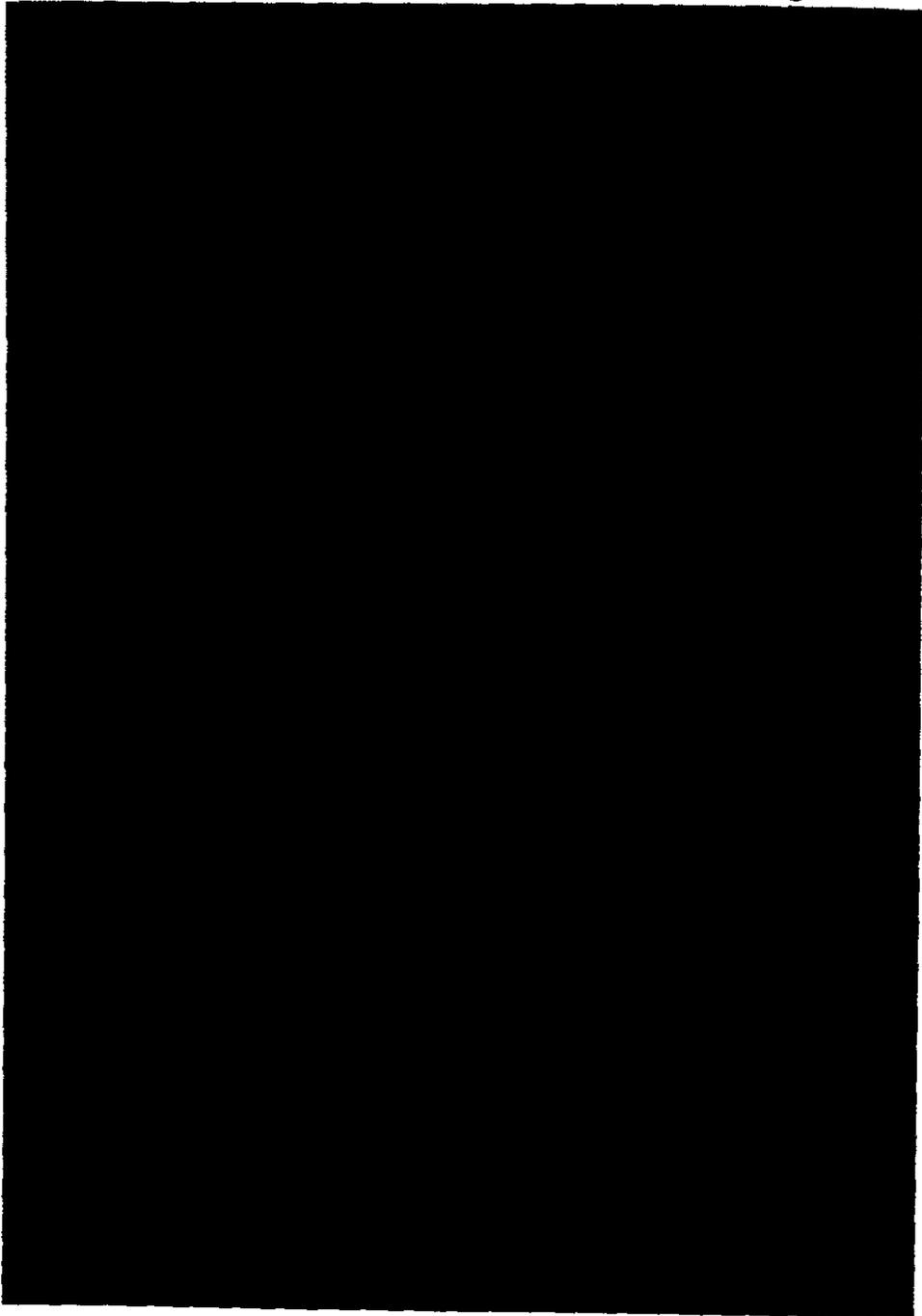


Figura 5 A y 5 B. La figura "A" es un corte de piel normal de una paciente con PPUPG teñida con avidina fluoresceinada para identificar mastocitos tisulares, note lo escaso de estas células. La figura "B" muestra piel afectada de esta dermatosis con un mayor número de mastocitos fluorescentes en dermis.

Figura 6 A

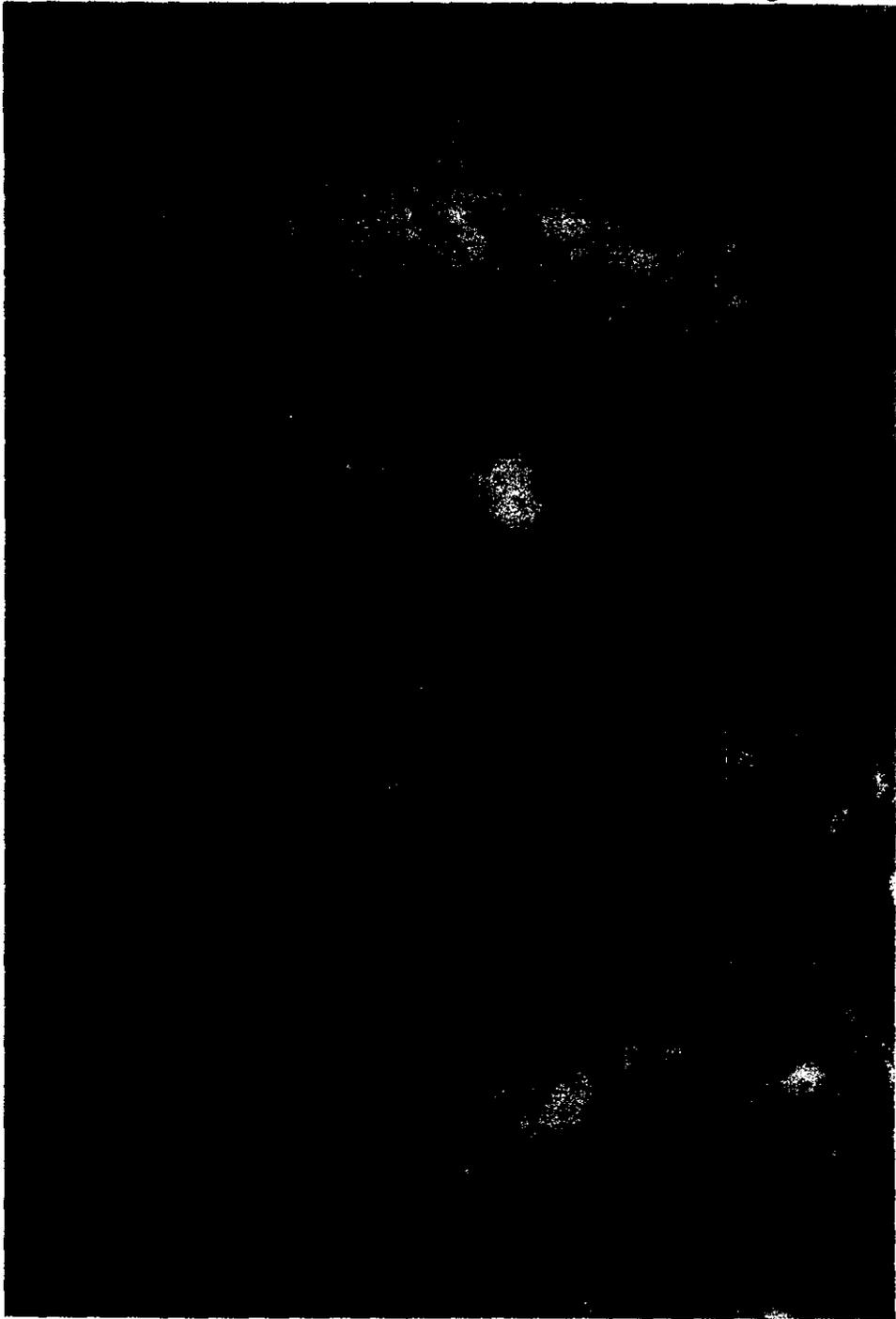


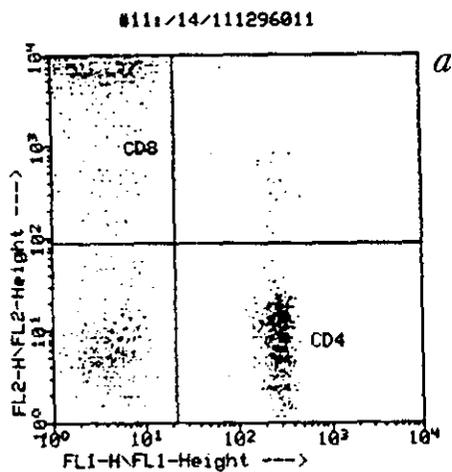
Figura 6 A y 6 B. La figura "A" corresponde a un corte de piel normal de una paciente con PPUPG teñido con inmunoperoxidasa para células CD4+, existen pocas células perivasculares. La figura "B" muestra un predominio de CD4+ perivasculares en un corte de piel afectada. la figura "C" es la imagen de piel afectada teñida con anticuerpos anti CD8+, existen escasa células positivas perivasculares.

Figura 6 B



Figura 6 C



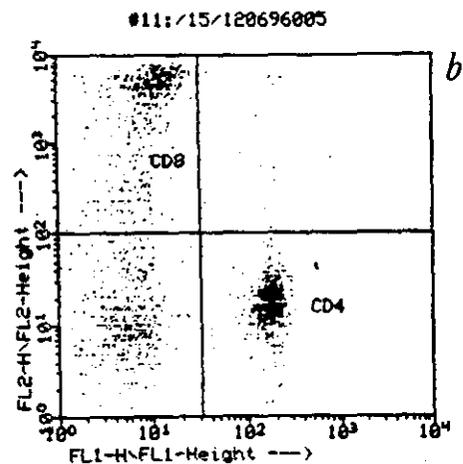


#11:/14/111296011

Quad Stats

File: #11:/14/111296011 Sample: MUCINO SOLORZANO CTRL+EMB CD4/8
 Date: 11/12/96 Gate G1= R1
 Parameters: FL1-H(LOG),FL2-H(LOG) Quad Location: 22.06,86.59
 Total= 10000 Gated= 1373

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	388	28.26 *	3.88	3.33	4219.31
2 UR	17	1.24	0.17	213.77	443.66
3 LL	418	30.44	4.18	3.91	6.12
4 LR	558	40.86 *	5.50	259.18	6.59



#11:/15/120696005

Quad Stats

File: #11:/15/120696005 Sample: REYNOSO CAB PG CD4/8
 Date: 12/ 6/96 Gate G1= R1
 Parameters: FL1-H(LOG),FL2-H(LOG) Quad Location: 32.1
 Total= 10000 Gated= 1778

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	482	27.11 *	4.82	8.27	2175.65
2 UR	21	1.18	0.21	144.28	729.61
3 LL	554	31.16	5.54	4.62	10.53
4 LR	721	40.55 *	7.21	159.81	15.91

Figura 7. Este diagrama muestra los porcentajes de las subpoblaciones de células CD4+ y CD8+ en una paciente control (A) en comparación con una paciente con PPUPG (B). Los valores señalados con un * son muy semejantes. Las demás pacientes tampoco mostraron ser muy diferentes de los controles.

Tabla 1. Se detallan las pacientes (23) con PPUPG comprendidas en este estudio. La paciente 24 y 25 no cuentan con estudios de citometría de flujo pero fueron incluidas en el grupo de pacientes con PPUPG en gestas múltiple.

edad. edad en años de la paciente; **G (gesta); P (para); A (aborto); C (cesárea);** **sdg.** edad gestacional en semanas cuando se presentó la dermatosis; **padecimientos asociados; APP.** amenaza de parto prematuro; **EHAG.** enfermedad hipertensiva asociada a la gestación; **esterl. prim.** esterilidad primaria; **DM-I gest.** diabetes mellitus tipo I gestacional; **infertl. 1a.** infertilidad primaria; **esteril. 1a.** esterilidad primaria; **AA.** amenaza de aborto.

paciente	edad	G-P-A-C	sdg	padecimientos asociados
1	31	I-0-0-0	puerp.	APP EHAG
2	20	II-0-I-0	38	
3	25	I-0-0-0	36	
4	32	I**-0-0-0	33	esteril. prim.
5	16	I-0-0-0	36	
6	23	I-0-0-0	26	
7	25	I-0-0-0	36	
8	24	I-0-0-0	36	
9	40	II-0-0-I	puerp.	DM-I gest.
10	28	I-0-0-0	35	
11	29	IV-0-III-0	35	infertl. Ia.
12	21	I-0-0-0	40	
13	25	I-0-0-0	32	esteril. Ia.
14	41	I-0-0-0	35	EHAG
15	36	V-I-II-I	29	DM-II enf. Raynaud
16	40	I-0-0-0	36	
17	25	II-0-I-0	36	hipotiroidea
18	21	I-0-0-0	36	
19	30	I-0-0-0	35	
20	18	I-0-0-0	puerp.	
21	17	I-0-0-0	35	
22	31	III-II-0-0	36	atopia
23	31	III-0-II-0	36	infertl. Ia. AA
24++	40	III-II-0-0	38	
25++	27	III-II-0-0	26	urticaria

paciente	edad	G-P-A-C	pareja	padcts. asociados
2	20	II-I-I-0	2a.	-
9	40	II-I-0-0	1a.	diabetes II
15	39	V-I*-II-I	2a.	diabetes II e. Raynaud
17	37	II-0-I-0	1a.	hipotiroid.
24	40	III-II-0-0	2a.	-
25	28	III-II-0-0	2a.	-

*óbito

Tabla 2. Aquí se enlistan las pacientes con gestaciones múltiples, es llamativo que 4 de ellas tuvieron gestaciones múltiples de diferente pareja siendo en las gestas subsecuentes cuando desarrollaron PPUPG. Lo habitual es que esta dermatosis se presente en primigestas. **Padcts. asociados.** padecimientos asociados. Las pacientes 24 y 25 no contaron con estudios de citometría de flujo.

Mastocitos en piel con PPUPG

avidina fluorescinada

piel sana

piel afectada

18 casos ++
6 “ +++

4 casos +
16 “ ++
12 “ +++
12 “ ++++

Tabla 3. La piel afectada de pacientes con PPUPG mostró una mayor cantidad de mastocitos en comparación con la piel no afectada. Los MC se identificaron usando técnicas de inmunofluorescencia directa en piel con avidina fluoresceinada.

INMUNOPEROXIDASA en PPUPG

piel normal		piel afectada	
CD4+	20% n= 20	CD4+	60% n= 20
CD8+	10% n= 20	CD8+	20% n= 20

Tabla 4. Las tinciones de piel normal y piel afectada en pacientes con PPUPG mostró un predominio de células T cooperadoras (CD4+) en el infiltrado inflamatorio de la piel afectada en comparación con células CD8+.

grupo	n	CD4+	CD8+	indice	NK
NGM	26	41+-6	29+-5	1.5+-0.3	7.5+-2
1er T	45	40+-6	29+-6	1.4+-0.4	10.6+-4
2do T	43	40+-7	31+-6	1.3+-0.4	14+-9
3er T	44	36+- 8	29+-8	1.4+-0.6	12+-8
PPUPG	23	38+-9	28+-7	1.6+-0.8	8+-5

p 0.05 vs NGM
p 0.05 vs
PPUPG

Tabla 5. Muestra los porcentajes correspondientes a las subpoblaciones celulares CD4+, CD8+ y de células NK ("natural killer") con citometría de flujo. PPUPG. placas y pápulas urticariales de la gestación; NG-M. controles no gestantes Mexicanas; 1er-T. primer trimestre de la gestación; 2do-T. controles del segundo trimestre y 3er-T. tercer trimestre de la gestación.

TAMIZ de HLA CLASE I y II en PPUPG

HLA-DR4	40%	DQ α 03	100%
" 0407	25%	DQ β 0302	75%
		0301	25%
HLA-DR 5	18%	DQ α 0501	50%
		DQ β 0302	30%
HLA-DR 8	15%	DQ α 0401	100%
HLA-DR 1 al 10	2%	DQ β 0402	100%

Tabla 7. La tipificación de moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad en las pacientes Mexicanas con PPUPG (n= 23) no mostró ser diferente de los controles del mismo grupo étnico (n= 100).

paciente	G-P-A-C	sdg	sexo/peso gm
1	I-0-0-0	37.6	m/2800
2	II-0-I-0	41	f/3250
3	I-0-0-0	35	f/3000
4	I**-0-0-0	37.4	m/2000 f/2100
5	I-0-0-0	39	m/3210
6	I-0-0-0	35	m/3660
7	I-0-0-0	36	m/3500
8	I-0-0-0	38	f/3500
9	II-0-0-I	37.6	f/3150
10	I-0-0-0	35	m/3500
11	IV-0-III-0	36	m/3000
12	I-0-0-0	35	m/3500
13	I-0-0-0	39	m/3450
14	I-0-0-0	40	m/3250
15	V-I-II-I	36.5	f/2770
16	I-0-0-0	39	m/2970
17	II-0-I-0	38	m/2840
18	I-0-0-0	36	f/3300
19	I-0-0-0	35	m/3200
20	I-0-0-0	38.6	f/2825
21	I-0-0-0	40	f/2525
22	III-0-II-0	38.6	f/3500
23	III-0-II-0	38	f/2735
24	III-II-0-0	39	f/2525
25	III-II-0-0	37	m/2800

*sdg

**gemelar

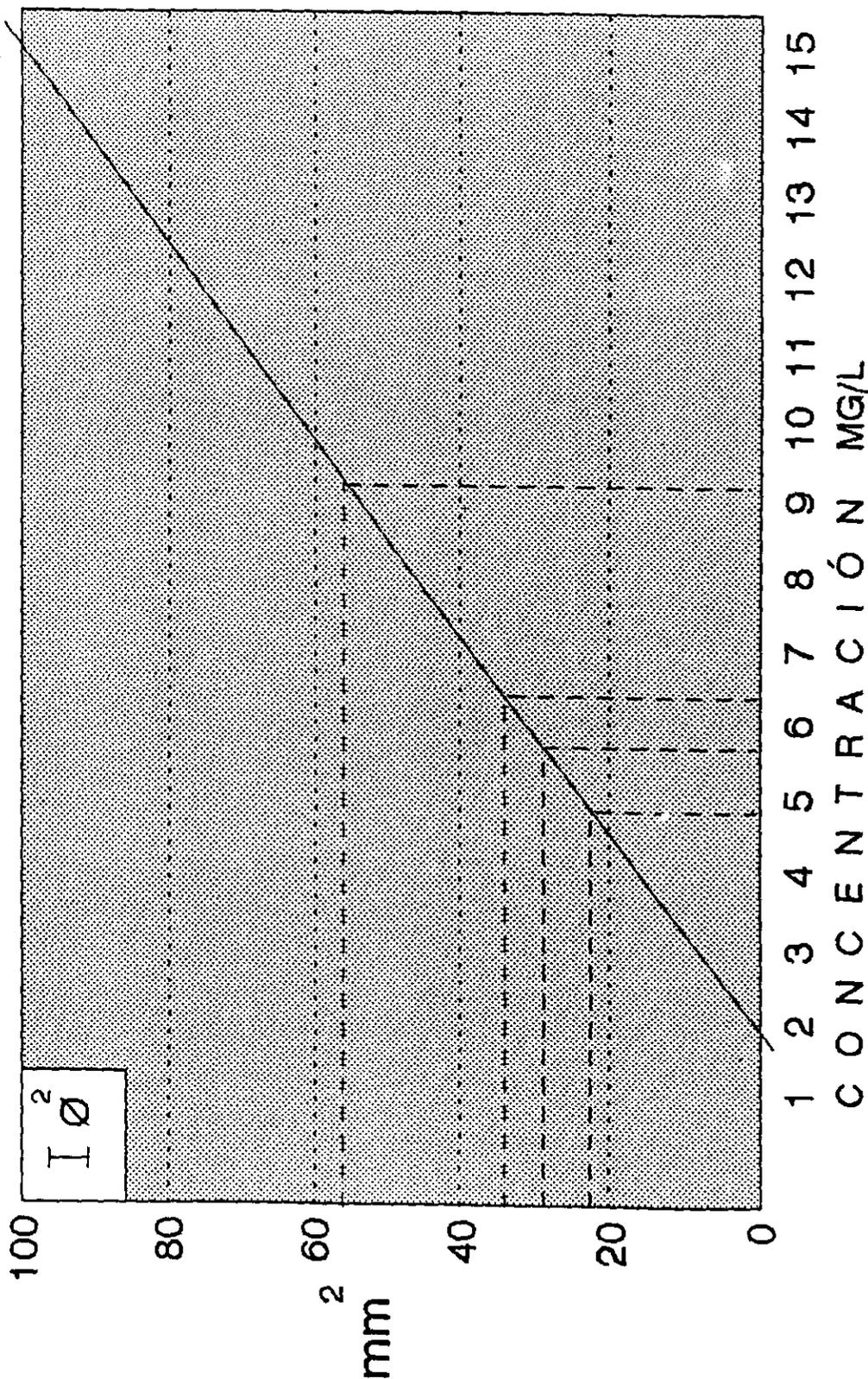
Tabla 6. Aquí se detallan las características de los recién nacidos en cuyas gestaciones se presentó PPUPG. **G-P-A-C** G (gesta), P (para), A (aborto), C (cesárea); **sdg.** semanas de gestación; **f.** femenino; **m.** masculino; peso gm (peso en gramos).

NOTA: los casos correspondientes a las pacientes 3, 7, 12, 18 y 19 fueron pacientes no atendidas en el INPer

IgE SÉRICA

PLACAS DE AGAROSA

Gráfica 1. Representa una curva de calibración para determinar IgE sérica en pacientes con PPUPG. Los cuatro ejemplos corresponden a controles positivos, ninguna de las pacientes con PPUPG mostró elevación de IgE sérica.

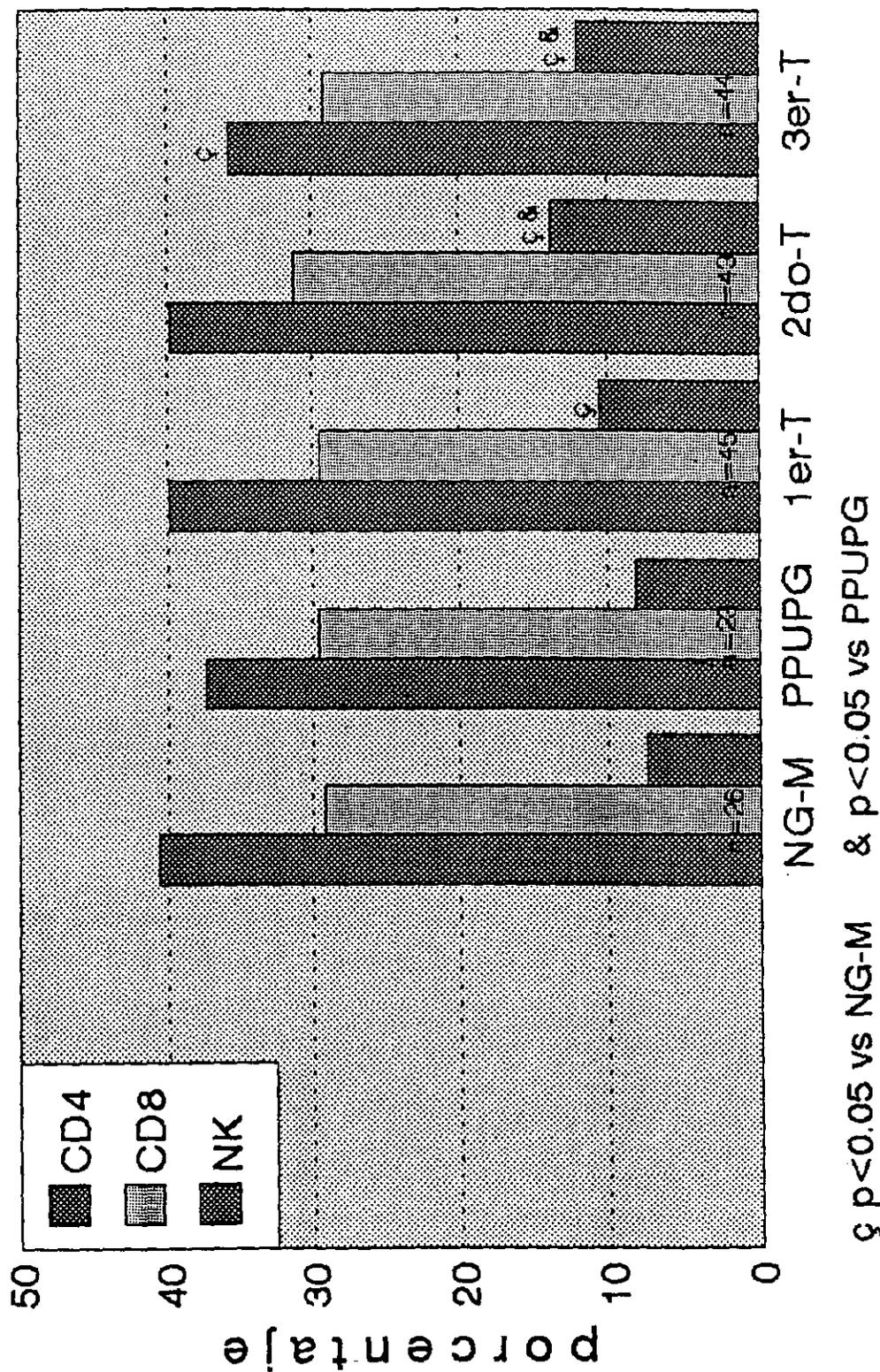


CITOMETRIA DE FLUJO

SUBPOBLACIONES CELULARES

Gráfica 2. Ilustra los porcentajes de las subpoblaciones de células CD4+, CD8+ y NK obtenidas con citometría de flujo en pacientes con PPUPG en comparación con pacientes control no embarazadas y los tres diferentes trimestres de la gestación. Estadísticamente no se observaron diferencias entre estos grupos ($p < 0.05$).

No gestantes Mexicanas (NG-M), pápulas y placas urticariales pruriginosas de la gestación (PPUPG) y controles Mexicanas en los diferentes trimestres de la gestación (1er-T, 2do-T, 3er-T).



CITOMETRIA DE FLUJO

INDICES CD4/CD8

Gráfica 3. Muestra índices CD4+/CD8+ de pacientes con PPUPG en comparación con controles no gestantes Mexicanas (NG-M) y controles Mexicanas en los diferentes trimestres de la gestación (1er-T, 2do-T, 3er-T). No hubo diferencias entre los grupos estudiados ($p > 0.05$).

