

11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

10

ANALISIS HAPLOTIPICO EN PACIENTES CON PLACAS Y PAPULAS URTICARIALES PRURIGINOSAS DE LA GESTACION: UN ESTUDIO EN MEXICANAS

DR. J. ROBERTO AHUED AHUED
DIRECTOR GENERAL
~~PROFESOR TITULAR~~

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

Jos. Antonio Ahued

DIRECCION DE ENSEÑANZA

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN:
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
P R E S E N T A
ESTHELA ARROYO DEL RIO

291729

DRA. EDITH **GARCIA GONZALEZ**
CULTAD DE MEDICINA
Sec. de Serv. Escolares

H. García
ABR. 26 2001



MEXICO, D. F.

Unidad de Servicios Escolares
MMM de (Posgrado)

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A *David*

Por su amor, apoyo y gran comprensión.

A mis *Padres*

Por su amor, ayuda y gran esfuerzo para permitirme llegar hasta donde estoy.

A mis *hermanos*

Por ser mis mejores amigos

Dra. *Edith García*

Por toda su ayuda y guiarme por el camino de la investigación.

Dr. *Julio Granados*

Por su gran colaboración, orientación y apoyo.

A *Alejandro Balbuena*

Por su gran ayuda.

INDICE

Introducción.....	5
Planteamiento del problema.....	7
Antecedentes bibliográficos.....	9
Justificación.....	27
Objetivos.....	29
Material y métodos.....	3
Resultados.....	48
Conclusiones.....	55
Bibliografía.....	57

INTRODUCCION

Durante la gestación ocurre un conjunto de cambios metabólicos y fisiológicos que influyen sobre diferentes órganos incluida la piel, la cual muestra ciertas modificaciones tales como: cambios dermatológicos propios del embarazo, así como también cambios sobre dermatosis preexistentes y finalmente dermatosis gestacionales (DG) que ocurren en alguna etapa del embarazo o en el puerperio⁽¹⁾. Las DG han sido reconocidas desde hace varias décadas, desafortunadamente solo dos ellas poseen características distintivas, mientras que el resto no están bien definidas lo que hace que la clasificación en ocasiones sea confusa. Las DG pueden clasificarse como: a) lesiones bien definidas caracterizadas por placas y pápulas urticariales pruriginosas de la gestación (PPUPG) y b) penfigoide de la gestación antes llamado “herpes gestationis”^(1,2). El PPUPG es la dermatosis de la gestación más frecuente no solo mundialmente sino también en México, es a su vez la más frecuente en el Instituto Nacional de Perinatología de México. Ocurre en 1:200 embarazos en forma internacional^(3,4) y en el Instituto Nacional de Perinatología su incidencia es aún mayor ya que ocurre en 1 de cada 100 embarazos⁽³⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este estudio fue diseñado para buscar las bases inmunogenéticas en aquellas pacientes con PPUPG no primigestas dado que esta dermatosis gestacional suele presentarse más en primigestas, para lo cual estudiamos a las pacientes con PPUPG con el propósito de reconocer las características distintivas entre primigestas vs multigestas. Se compararon también las diferencias entre estos dos grupos con respecto a sus antecedentes gineco-obstétricos así como también la presencia de distintas parejas en diferentes gestaciones.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

GENERALIDADES

Las dos DG bien caracterizadas son: el penfigoide de la gestación (antes mal llamado “herpes gestationis”) y las placas y pápulas urticariales y pruriginosa de la gestación (PPUPG). El motivo de nuestro estudio se enfocó a ésta última por ser la DG más frecuente en el Instituto de Perinatología. La literatura reporta una incidencia de 1 en 160-200 embarazos. ^(3,5)

El PPUPG representa la DG más frecuente, fue descrita originalmente por Lawley TJ y colaboradores en 1979, y en su inicio se le conoció con el nombre de prurigo tardío del embarazo o erupción polimórfica del embarazo.

^(1,6)

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 piensa que se vuelve antigénica, siendo

las características desencadenantes: primer embarazo, tercer trimestre de la gestación, embarazos gemelares, gran aumento de peso durante el embarazo, peso del RN_(7,8,9,11-13)

Publicaciones más recientes reportan una respuesta materna a los antígenos paternos presentes en el componente fetal de la placenta como posible causante de esta DG. La naturaleza de la influencia materna parece ser determinante, pero se expresa presuntamente en forma de antígenos paternos presentes en el componente fetal de la placenta. Esta expresión de antígenos paternos puede ocurrir tardíamente en el embarazo o ser liberados a la circulación materna con degeneración placentaria cercano al término o al nacimiento, la consiguiente reacción inmunológica no daña al feto, el cual permanece protegido por la tolerancia inmune que rodea al alomjerto.⁽⁸⁾ Aractingi ha sugerido, que las células fetales pueden invadir la piel materna durante el embarazo y su presencia pudiera estar asociada con el desarrollo de alteraciones de la piel, en un estudio realizado por el mismo autor se detectó DNA masculino en dermis o epidermis de las lesiones de la piel lo que podría estar relacionado con el desarrollo del PPUPG.⁽¹⁰⁾

En un estudio que incluyó la determinación de los antígenos de HLA en los recién nacidos encontró HLA idénticos en ambos RN afectados y no afectados excluyendo relación alguna entre PUPPG y los antígenos HLA de clase I. Sin embargo se piensa que existe un factor genético no reconocido, basado en una observación de la existencia de la enfermedad inusual entre familiares con hermanos casados con hermanas y hermanos gemelos casados con hermanas gemelas⁽⁸⁾.

En el Instituto Nacional de Perinatología, las dermatosis de la gestación constituyen un 25% de la consulta de Dermatología y su importancia no solo reside en la frecuencia dentro del Instituto sino en el reto diagnóstico que representa ya que es una patología poco conocida desde el punto de vista clínico.

CARACTERISTICAS CLINICAS

El PPUPG suele presentarse en el tercer trimestre de la gestación, se presenta principalmente en pacientes primigestas en el 75% de los casos,⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ aunque

también ocurre en multigestas y sobre todo en embarazos gemelares en un porcentaje que va del 10 hasta 30%.^(1,2,7)

Esta dermatosis gestacional tiene una topografía característica, aparecen primero en el abdomen, suelen empezar sobre las estrías en el 90% de los casos ⁽¹⁷⁾ y respetan el ombligo, las lesiones se extienden a miembros inferiores, superiores y glúteos, respetando la cintura escapular y cara. Clínicamente la lesión primaria es una pápula urticarial que confluye con otras para formar placas urticariales muy pruriginosas, siendo el principal síntoma el prurito en el 100% de las pacientes, se ha reportado que en el 74% de las pacientes presentan dificultad para dormir por la presencia del prurito^(8,12) La erupción desaparece después del parto. ^(14,15)



Figura 1 Esta fotografía ilustra la imagen del PPUPG en una paciente en el tercer trimestre de la gestación. Las lesiones inician en las estrías, respetan ombligo y después se extienden a miembros superiores e inferiores.

Debido a que el PPUPG se presenta solo en mujeres embarazadas se han propuesto mecanismos hormonales para lo cual se han hecho mediciones de fracción B de gonadotropina coriónica en sangre, estradiol y cortisol además de estríol urinario no encontrándose alteraciones hormonales en pacientes con PPUPG comparadas con mujeres embarazadas normales. (4)

RIESGOS PERINATALES

El PPUPG no está asociado con riesgos perinatales pero puede ser de difícil diagnóstico y tratamiento cuando no se está familiarizado con la enfermedad.

En estudios reportados no se ha observado la presencia de lesiones en los recién nacidos o la ocurrencia de bajo peso o prematuridad. (7,14-16,19,20)

HISTOPATOLOGIA

En la histología del PPUPG no existe un patrón específico, usualmente se ha encontrado un infiltrado mononuclear perivascular con eosinófilos y edema en dermis papilar, con espongiosis focal en epidermis y paraqueratosis.

(3,4,2) Generalmente la inmunofluorescencia directa de la piel afectada no muestra depósitos de IgG o de C₃ (6,14,21,22)

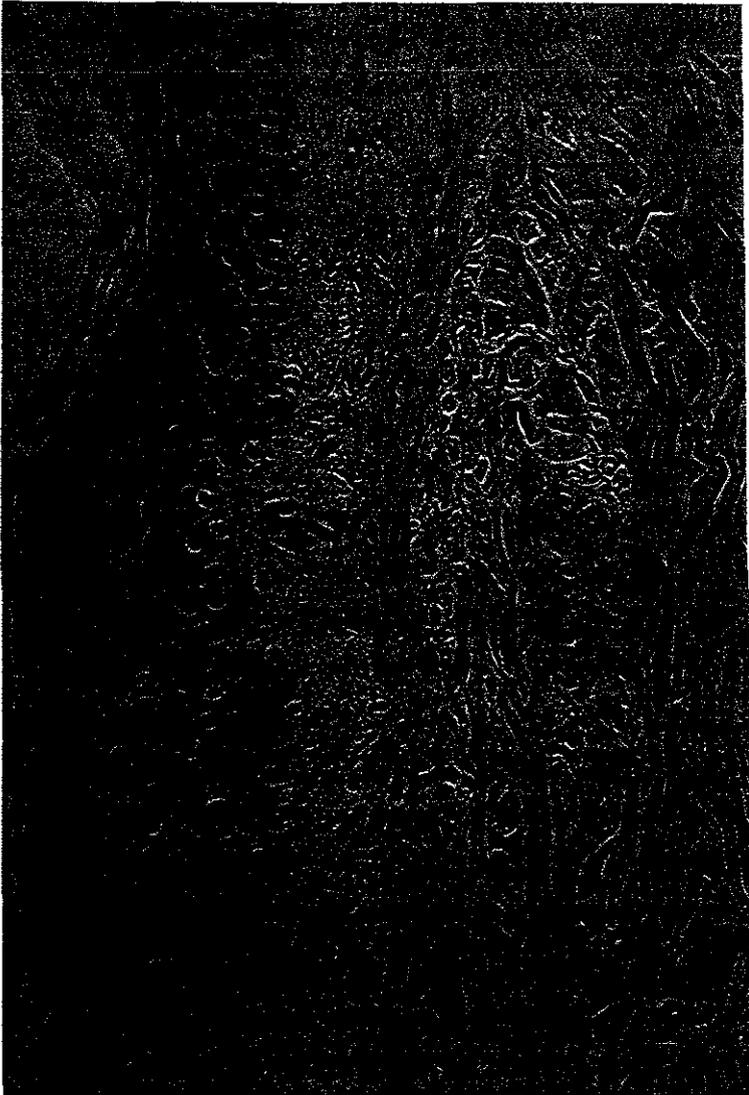


Figura 2. Microfotografía de una biopsia de piel teñida con hematoxilina/eosina afectada con PPUPG. La imagen corresponde a una urticaria con infiltrado linfocitario perivascular y eosinófilos.

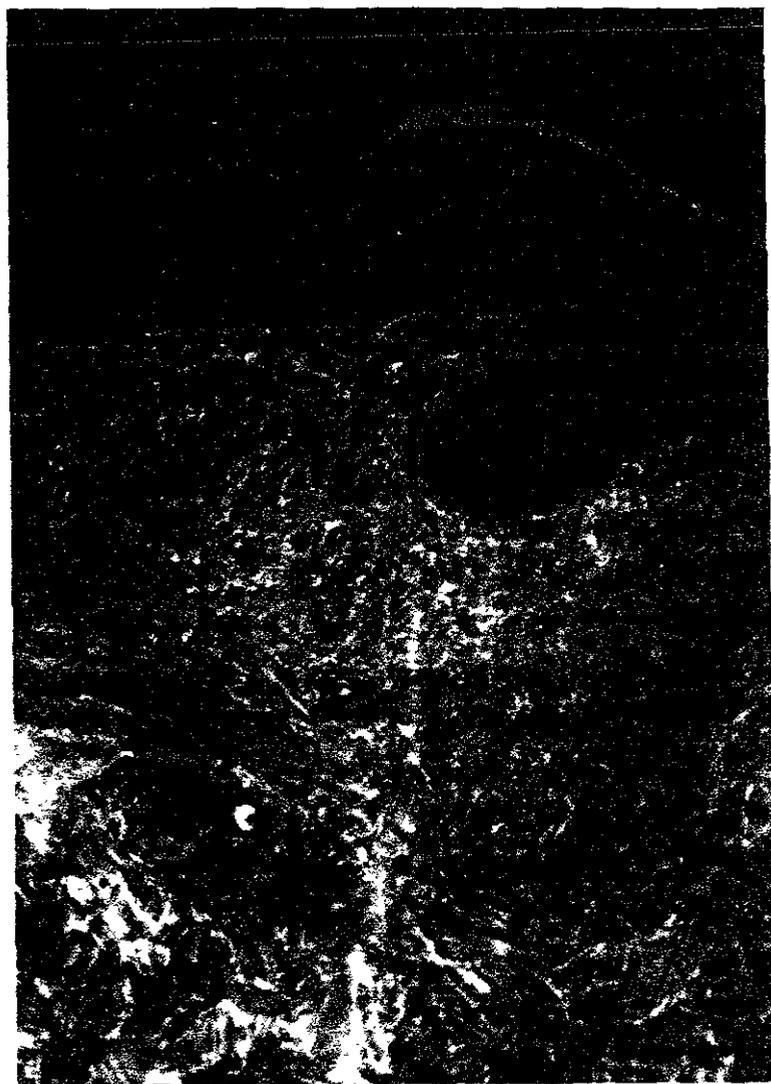


Figura 3. Imagen correspondiente a inmunofluorescencia directa en piel afectada de una paciente con PPUPG sin depósitos inmunes.

Se ha descrito que en la dermis de las pacientes con PPUPG existe un depósito de sustancias que inducen la proliferación de fibroblastos, por lo que se asume que esta sustancia (sustancia F) se produce solamente en el embarazo y es probablemente producto de la placenta ya que durante el tercer trimestre hay un envejecimiento de la placenta y se libera la sustancia F a la circulación e induce la proliferación de fibroblastos en la piel; se considera que esta es la causa por la que la mayoría de las pacientes sufren de esta dermatosis en el tercer trimestre y el hecho de que no exista recurrencia en embarazos posteriores se debe a la presencia de inmunidad contra la sustancia F. (17)

TRATAMIENTO

El tratamiento es sintomático, la mayoría de las pacientes obtienen alivio de las manifestaciones clínicas con el uso de esteroides tópicos como la hidrocortisona, betametasona o triamcinolona al 0.1% o halcinónido dos veces por día; con ello mejoran el prurito y también las lesiones hasta en el 80% de los casos. Debido a que esta DG se presenta al final de la gestación su tratamiento no suele prolongarse más allá de dos semanas. El uso de antihistamínicos no es recomendable y por otra parte, su acción sobre el

prurito no es mayor que la de los esteroides tópicos; por lo que su uso constituye un riesgo innecesario que debe evitarse.⁽²⁰⁾

Existen casos más agresivos desde el punto de vista clínico, generalmente corresponden a los que se presentan en embarazos gemelares o en los casos refractarios al tratamiento tópico. En estos casos se pueden utilizar esteroides sistémicos como la prednisona a dosis de 0.5mg/kg/día en una sola dosis matutina para posteriormente disminuir la dosis paulatinamente. ⁽²⁰⁾

Se debe evitar el uso de jabones perfumados y alcalinos ya que aumentan el prurito, deben sustituirse por productos hechos con lauril sulfato sódico. Se recomienda evitar la exposición al sol y los baños con agua caliente, ya que ésta aumenta la degranulación de mastocitos y por lo tanto el prurito. Con o sin tratamiento la dermatosis y el prurito desaparecen espontáneamente pocos días después del parto. ^(6,12,23)

PRONOSTICO

El pronóstico de las pacientes con PPUPG es bueno, los síntomas desaparecen de 10 a 14 días postparto y no existe recurrencia en embarazos subsecuentes.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Se debe hacer principalmente con el penfigoide gestacional, ya que este último si tiene repercusión perinatal. En el cuadro siguiente se exponen las principales características de ambas dermatosis. (20)

CARACTERISTICAS	PPUPG	PENFIGOIDE GESTACIONAL
<i>Clínicas</i>	<input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Pápulas <input type="checkbox"/> Placas urticariales	<input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Ronchas <input type="checkbox"/> Pápulas <input type="checkbox"/> Vesículas <input type="checkbox"/> Bulas tensas a la presión
<i>Localización anatómica</i>	<input type="checkbox"/> Abdomen <input type="checkbox"/> Extremidades superiores e inferiores <input type="checkbox"/> Respeta cara y mucosas	<input type="checkbox"/> Abdomen <input type="checkbox"/> Extremidades superiores e inferiores <input type="checkbox"/> Afecta palmas y plantas <input type="checkbox"/> Respeta cara y mucosas
<i>Sintomatología</i>	<input type="checkbox"/> Prurito ++	<input type="checkbox"/> Prurito ++++ <input type="checkbox"/> Malestar general, fiebre <input type="checkbox"/> Náusea
<i>Laboratorio</i>	<input type="checkbox"/> Ninguno específico	<input type="checkbox"/> Leucocitosis, eosinofilia
<i>Histopatología</i>	<input type="checkbox"/> Infiltrado inflamatorio perivascular, eosinófilo, edema papilar, espongiosis focal en epidermis. <input type="checkbox"/> Inmunofluorescencia directa negativa	<input type="checkbox"/> Vesículas subepidérmicas, infiltrado linfocítico <input type="checkbox"/> Inmunofluorescencia directa positiva para depósitos de C3 en la unión dermoepidérmica <input type="checkbox"/> Detección de antígeno HG por ELISA
<i>Tratamiento</i>	<input type="checkbox"/> Esteroides tópicos	<input type="checkbox"/> Prednisona 1mg/kg/día
<i>Riesgos perinatales</i>	<input type="checkbox"/> Ninguno	<input type="checkbox"/> Prematuridad <input type="checkbox"/> Bajo peso al nacer <input type="checkbox"/> Oligohidramnios <input type="checkbox"/> Muerte fetal.

ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LA GESTACION

Durante la gestación existe una interacción bidireccional entre el sistema inmune materno y el sistema reproductivo basado en las células TH₁ y TH₂. En términos generales las TH₁ son contrarias al sostenimiento del embarazo porque tienen un papel central en el rechazo agudo de injertos por mecanismos como la hipersensibilidad retardada y la actividad citotóxica de los linfocitos T. De la misma manera el interferón gama inhibe el crecimiento trofoblástico y junto con el factor de necrosis tumoral alfa inhiben el desarrollo embrional y fetal. (5,24,25)

En contraste, las citocinas provenientes de células TH₂ (interleucinas 3,4,5 y 10) son esenciales para inducir y mantener la tolerancia de injerto por lo tanto son muy importantes durante el período que dura el embarazo, considerando al embarazo como un injerto. (24,26)

A nivel de la interfase materno fetal es donde la interacción de factores TH1 y TH2, las citocinas TH1 tratando de inhibir el embarazo mientras que las TH2 lo favorecen; este tipo de interacciones biológicas se realiza directamente a través de las citocinas antes mencionadas. (24,26)

La progesterona por su parte favorece la producción de citocinas TH₂ específicamente en la interfase materno fetal, estas citocinas también regulan el factor inhibidor de leucemia que es imprescindible para la implantación del embrión.

Recientemente se ha postulado que una respuesta inmune celular anormal TH₁ a antígenos reproductivos es la hipótesis más plausible para la pérdida gestacional inmunológica, estas mujeres tienen disminución en la producción de IL-4 e IL-10 por la decidua y elevados niveles séricos de células NK.^(27,28)

Se sabe también que la respuesta TH₂ en embarazos normales provoca incremento en la producción de anticuerpos haciendo al embarazo un período vulnerable para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (mediadas por anticuerpos). Sin embargo la respuesta TH₂ permite la producción de anticuerpos que son útiles para el feto, ya que éstos pasan la barrera placentaria, lo que resulta en una inmunidad protectora para el neonato antes del desarrollo de su propio sistema inmune. ⁽⁵⁾

En contraste, la mujer embarazada sufre cambios en su inmunidad mediada por células lo que resulta en susceptibilidad aumentada para desarrollar infecciones también existe modificación del curso de otras enfermedades como la artritis reumatoide en la que puede ocurrir remisión temporal durante la gestación.

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El MHC está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano (6p21.3). Ocupa 4000 Kb de DNA y está constituido por tres clases de genes. Hacia la región telomérica se localiza la región clase I que incluye los loci HLA-A,B,C; hacia el centrómero está la región clase II que se subdivide en cuatro regiones (DP,DO/DZ, DQ, DR). Entre las regiones clase I y clase II está la región clase III, con una gran variedad de genes entre los que están los que codifican para los componentes C2, factor B, C4A y C4B.^(29,30)

Los genes clase I, II y III se heredan de manera mendeliana codominante, las moléculas clase I se expresan en las membranas de todas las células nucleadas excepto en neuronas y trofoblastos maduros, difícilmente localizables en los

linfocitos. Las moléculas de clase II se expresan en macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células de Langerhans y células dendríticas.

Los alelos de los loci del MHC de cada cromosoma en particular constituyen un haplotipo en consecuencia el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro paterno.⁽³⁰⁾

El estudio de asociación del MHC con un padecimiento es complejo, ya que los alelos asociados con algunas enfermedades también están presentes en la población normal; además, en otros casos un mismo alelo se asocia con más de una enfermedad.⁽³⁰⁾

En el caso de las dermatosis gestacionales solo en el penfigoide gestacional se ha encontrado que los haplotipos predisponentes están marcados por los alelos HLA-DR3 y DR4.⁽¹¹⁾

La placenta es el factor principal en la supervivencia del feto. El citotrofoblasto extraveloso invade el tejido materno y está expuesto directamente al sistema inmune materno. El trofoblasto no expresa las moléculas clase I, lo cual es esencial para evitar una respuesta inmune

materna, cuando se expresa la clase II en el trofoblasto puede ocurrir el aborto. La regulación en la expresión de las moléculas clase I del MHC es un fenómeno de adaptación biológica mayor, que protege al feto del reconocimiento de las células inmunes y su destrucción.⁽⁵⁾

Se sabe que el citotrofoblasto extraveloso expresa un gen específico del MHC clase I, es una molécula recientemente descrita que se conoce como HLA-G. Las células trofoblásticas positivas para HLA-G pueden migrar a la circulación materna y pueden ser detectadas por citometría de flujo. Se ha sugerido que el HLA-G puede tener un papel importante en las interacciones inmunológicas maternofetales durante el embarazo, pero su función no está aún bien precisada; a pesar de ello, se ha propuesto que protege al trofoblasto de la acción de las células NK maternas.

La expresión del HLA-G es importante en el reconocimiento inmune del tejido fetal así como en la invasión trofoblástica. ^(5,31)

Por otro lado se sabe que existen anticuerpos maternos específicos producidos por los linfocitos B que reaccionan contra antígenos HLA paternos ⁽²¹⁾.

JUSTIFICACION

El PPUPG es la dermatosis gestacional más frecuente en el Instituto Nacional de Perinatología, se ha descrito la presencia de DNA fetal en las lesiones lo que sugiere que la dermatosis se debe a una respuesta inmune materna contra las células fetales localizadas a nivel de la dermis y epidermis, lo que se sustenta por la presencia de infiltrado inflamatorio en dichas lesiones. De ahí la importancia de analizar el locus HLA-DRB1 del MHC para describir su distribución en las pacientes, parejas y controles.

OBJETIVOS

- 1) Describir la presencia del PPUPG en pacientes primigestas o multigestas

- 2) Describir y analizar la frecuencia de los alelos del locus DRB1 del MHC en pacientes con PPUPG.

- 3) Comparar las frecuencias de los alelos del locus DRB1 entre pacientes y controles, pacientes y esposos .

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

Se incluyeron en el estudio a 55 pacientes con PPUPG que fueron vistas de manera consecutiva en el Instituto Nacional de Perinatología de la ciudad de México de Enero de 1996 a Mayo de 1999, se entrevistó a las pacientes y 20 de ellas aceptaron acudir con sus parejas aceptaron. Se revisaron los expedientes clínicos y se pidió firmar un consentimiento previo a la toma de muestras. Para el diagnóstico se tomó en cuenta tanto los criterios clínicos como los datos histológicos de la biopsia de piel en luz normal y en inmunofluorescencia directa.

CONTROLES

Las muestras para los individuos del grupo control se obtuvieron de 96 sujetos mestizos mexicanos sanos que nacieron en México al igual que sus últimas dos generaciones.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de casos y controles. Transversal, observacional y prospectivo.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes gestantes mestizas mexicanas con diagnóstico de PPUPG realizado en base a sus características clínicas antes descritas y por inmunofluorescencia indirecta.
- No haber recibido ningún tipo de tratamiento.
- No padecer enfermedad de tipo autoinmune.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Pacientes con dermatosis gestacional en las cuales no se corroboró diagnóstico de PPUPG.
- Pacientes no mestizas mexicanas.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Pacientes en las cuales no se logró la extracción de DNA.
- Abandono voluntario del estudio.

TECNICAS UTILIZADAS PARA LA TIPIFICACION DEL LOCUS

DRB1 del MHC.

Equipo

- Campana de extracción
- Termociclador
- Lámpara de rayos UV
- Incubadora para hibridación
- Baño de agua
- Fuente de vacío
- Cámara fotográfica

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 duodecil 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

Por venopunción se tomaron 3ml de sangre periférica de pacientes y esposos y se usó como anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetracético), al 2%.

Técnicas

Extracción del DNA ⁵³

- colocar 3 ml de sangre (EDTA) en un tubo Falcon de 50 ml
- agregar 30 ml de PBS y centrifugar a 2000 rpm durante 10 min

- tirar el sobrenadante y al botón agregarle 50 ml de solución de lisis (AKC), incubar 30 minutos y centrifugar 1500 rpm por 10 minutos
- desechar el sobrenadante y colocar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos
- desechar el sobrenadante y agregar AKC, agitar y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos
- desechar el sobrenadante y colocar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos
- desechar 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 de 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

Tipificación molecular de alelos DRB1 del MHC

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

Amplificación por reacción de polimerasa en cadena (PCR) ^{54,55}.

- Se preparó una mezcla que contenga mezcla de todo lo necesario para realizar la amplificación y que a continuación se lista:
- 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 se colocaron 2ul de DNA de cada individuo en los tubos de PCR. Se añadieron 47.5 ul de la mezcla anterior a cada tubo (mezclando DNA y solución) y se agregaron dos gotas de aceite mineral para evitar la evaporación.

Posteriormente los tubos se colocaron en el termociclador el cual se programó con las siguientes condiciones:

- 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 se corroboró por medio de un gel de agarosa al 1%. Se mezclaron 5 µl de cada muestra con 7 µl de colorante naranja G. Ésta mezcla se corrió en el minigel de agarosa a 50 volts durante 30 minutos. Las bandas positivas se observaron en un transiluminador UV y se comparó su corrimiento con el de un marcador de peso molecular conocido.

Finalmente las muestras amplificadas se guardaron para realizar la hibridación.

Los iniciadores usados en el presente trabajo son los específicos para las regiones genéricas DRB1, además del específico para la región DRB3 (izquierdo y derecho en ambos casos).

Marcaje de las sondas

Cada sonda en cantidad de 95 pmoles se mezcló con 4ul de buffer para terminal transferasa, 4 ul de solución de CoCl 25 mM, 1 ul de ddUTP-D₁g (1 nmol/ul) y 1.5 unidades de terminal transferasa.

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

El oligonucleótido marcado se precipitó con 2.5 ul de LiCl 4 M y 85 ul de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C, después de mezclarlas se mantuvieron a -80°C durante 15 minutos y después a -20°C durante 2 hrs o toda la noche. Posteriormente se realizó el siguiente procedimiento. 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

- **Tratamiento de la membrana:** La membrana de nylon se cortó en cuadros de 10 cm² y se marcó en cuadros pequeños de 1 cm². La membrana se humedeció con agua destilada, posteriormente se coloca en una solución de SSPE 10X durante 15 minutos. Se secó en el horno a 60°C.

- **Colocación de las muestras:** En cada cuadro de 1 cm² se colocaron 2 ul del DNA amplificado. La membrana se secó a temperatura ambiente y posteriormente en el horno a 80°C (puede fijarse el DNA usando un transiluminador UV). Una vez colocado el DNA en la membrana se procedió 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 se neutralizó colocándola en una solución de NaCl 1.5M/Tris-Base 0.5M pH 7.4 por un minuto. Finalmente la membrana se horneó a 80°C y se colocó en el transiluminador UV por 3 minutos.

- **Hibridación:** Las membranas que contienen el DNA amplificado, fueron 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 fueron empapadas 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 realizó a 42°C durante toda la noche. Las membranas fueron 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 lavó con una solución de TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lavó 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 eliminó el exceso de líquido poniendo la membrana sobre un papel filtro unos segundos, sin dejarlos secar.
- Los lavados siguientes se realizaron a temperatura ambiente en agitación y usando recipientes de plástico cubriendo las membranas.
- Una vez eliminado el exceso de TMAC las membranas fueron lavadas en la solución de revelado 2 durante 5 minutos, después se lavaron en solución de revelado 3 durante 30 minutos
- Se incubó en solución 3 conteniendo el anticuerpo anti-digoxigenina en una solución de 1:10000 durante 30 minutos.
- Se lavó 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.
- Se incubó 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)
- Se eliminó el exceso de AMPPD poniendo la membrana unos segundos en papel filtro (no dejar secar). La solución diluida de AMPPD se conservó a 4°C en la obscuridad y se reutilizó varias veces.

- Se colocó la membrana en una bolsa nueva de hibridación y se selló e incubó a 37°C durante 15 minutos en baño maría.
- Finalmente se expuso 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 incubó la membrana en una solución de NaOH 0.4 M a 42°C durante 20 minutos. Se quitó el exceso de NaOH con papel filtro y la membrana se incubó 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 dejó secar a temperatura ambiente y se verificó la ausencia de oligonucleótido utilizando el transiluminador UV.

ANALISIS ESTADISTICO

La significancia de las diferencias entre los grupos fue realizada utilizando el análisis de X^2 de Mantel-Haenszel combinando las tablas de contingencia de 2X2 para lo cual se usó el programa estadístico EPIINFO (STATCALC).

Si el número de alguna célula era <5 se utilizó la prueba exacta de Fisher. El valor de P se corrigió de acuerdo a Yates. La razón de momios (RM) determinó los intervalos de confianza al 95% (95% CI).

RESULTADOS

De las 20 pacientes estudiadas, a 3 pacientes no se les pudo extraer DNA útil por lo que el número de pacientes incluidas fue 17 (n=17), de las cuales 7 pacientes fueron primigestas [41%] y 10 multigestas [59%]. Gráfica 1

GRAFICA 1

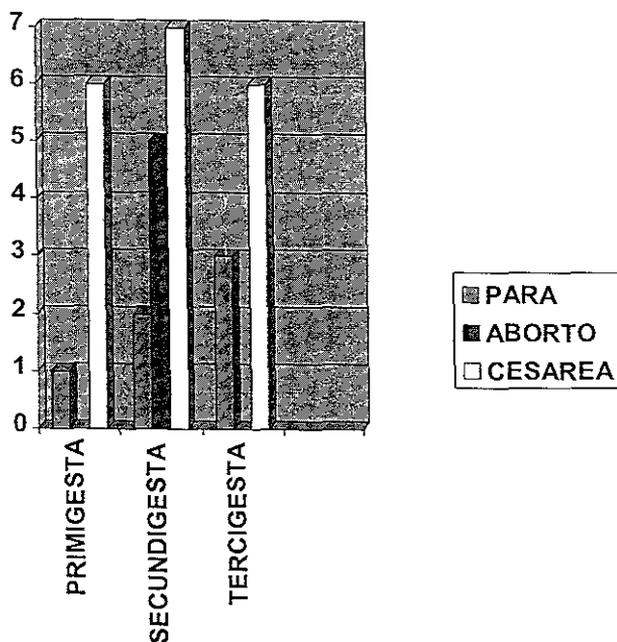
ANTECEDENTES OBSTETRICOS



El 11.7% (2) de las pacientes cursaba con embarazo gemelar. Se evaluó además el número de eventos obstétricos. Gráfica 2

GRAFICA 2

ANTECEDENTES OBSTETRICOS

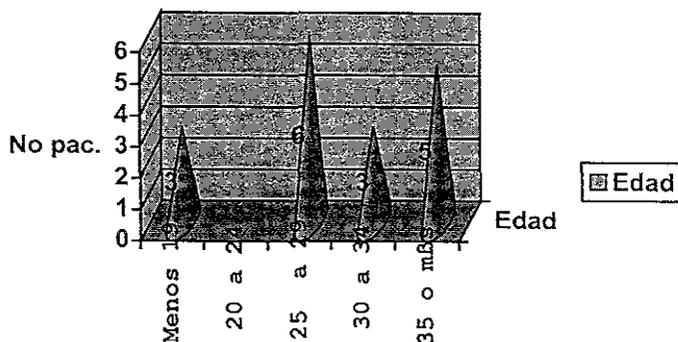


La edad promedio de las pacientes fue de 28.2 años con un margen de 16 a 38 años. Gráfica 3 El desarrollo de la dermatosis ocurrió en 16 pacientes (94.1%) en el tercer trimestre de la gestación y 1 paciente (5.9%) lo desarrolló en el puerperio inmediato. La paciente que presentó la dermatosis gestacional durante el puerperio inicio en el primer día postcesárea. La edad gestacional promedio en la cual se desarrolló la dermatosis fue a las 36.2 semanas de

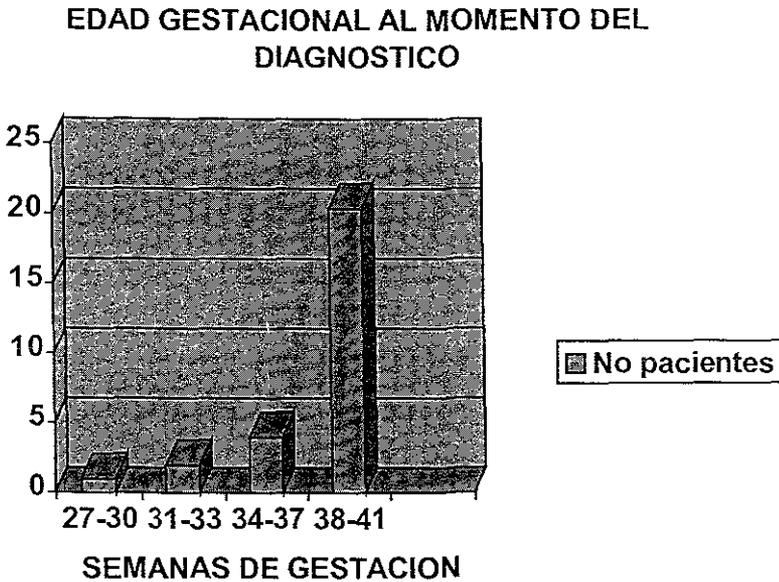
gestación con márgenes de las 27-40.2 semanas. Gráfica 4 El 100% de las pacientes presentaron prurito. Solo 2(11.7%) pacientes tuvieron diferente pareja en esta gestación y ninguna había presentado la dermatosis en gestaciones anteriores.

GRAFICA 3

DISTRIBUCION POR EDAD MATERNA



GRAFICA 4



El análisis de frecuencia génica de alelos de DRB1 en pacientes y controles mostró incremento de los alelos HLA- DR14, DR1 comparado con los controles [0.176 vs 0.109] y [0.147 vs 0.052] respectivamente además se observó disminución de los alelos HLA-DR3, DR8, DR11, DR7 de [0.088 vs 0.057], [0.059 vs 0.167], [0.059 vs 0.143], [0.029 vs 0.109] respectivamente, pero sin significancia estadística al corregir el valor de P. Tabla 1

TABLA 1

DRB1	Pacientes N=17				Esposos N=14				Controles N=96				P (<0.05)		
	n	fg	n	fa	n	fg	n	fa	n	fg	n	fa	P vs C	E vs C	P vs E
DR4	9	0.265	8	0.471	7	0.250	6	0.429	46	0.240	38	0.396	NS	NS	NS
DR14	6	0.176	5	0.294	2	0.071	2	0.143	21	0.109	20	0.208	NS	NS	NS
DR1	5	0.147	5	0.294	4	0.143	4	0.286	10	0.052	10	0.104	NS	NS	NS
DR2	3	0.088	3	0.176	2	0.071	2	0.143	18	0.094	18	0.188	NS	NS	NS
DR3	3	0.088	3	0.176	1	0.036	1	0.071	11	0.057	10	0.104	NS	NS	NS
DR8	2	0.059	2	0.118	4	0.143	4	0.286	32	0.167	25	0.271	NS	NS	NS
DR11	2	0.059	1	0.059	2	0.071	2	0.143	18	0.094	17	0.177	NS	NS	NS
DR13	2	0.059	2	0.118	3	0.107	3	0.214	10	0.052	10	0.104	NS	NS	NS
DR7	1	0.029	1	0.059	3	0.107	3	0.214	21	0.109	20	0.208	NS	NS	NS
DR12	1	0.029	1	0.059	-----	-----	-----	-----	2	0.010	2	0.021	NS	NS	NS
DR9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2	0.010	2	0.021	NS	NS	NS
DR10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.005	1	0.010	NS	NS	NS

fg : frecuencia génica.
fa : frecuencia antigénica
N : número de individuos

E : esposos
C : controles
P : pacientes

n : número de alelos
NS : Estadísticamente no significativo

Al analizar la frecuencia antigénica de pacientes y controles se observó en el alelo DR4 y DR1 aumento de la frecuencia antigénica respecto a los controles [0.471 vs 0.429] y [0.294 vs 0.104] respectivamente y disminuida en los alelos HLA-DR7, DR8, DR11 [0.059 vs 0.208], [0.118 vs 0.271] y [0.059 vs 0.177] respectivamente pero ninguna de estas diferencias tuvo significancia estadística al corregir el valor de P por el número de comparaciones. Tabla 1

CONCLUSIONES

El origen del PPUPG aún es desconocido y de acuerdo al presente estudio es difícil sustentar la asociación de HLA y con PPUPG, lo cual concuerda con lo referido en la literatura internacional, sin embargo cabe notar en los casos de PPUPG los incrementos de los alelos HLA-DR1 y DR6 así como la disminución del HLA-DR8 los que probablemente en un tamaño de muestra mayor pueda tener significancia estadística.

Consideramos que el desarrollo del PPUPG es debido a una respuesta materna a antígenos de origen paterno, creemos el grupo de pacientes estudiado es insuficiente por lo que debe ampliarse con un mayor número de pacientes. Por otro lado se ha observado que pacientes que en su primer embarazo han tenido aborto y posteriormente logran un embarazo a término con una diferente pareja pudiera explicar una posible incompatibilidad a los antígenos del sistema HLA.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Yancey KB, Hall RP, Lawley TJ. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. Clinical experience in twenty five patients. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10: 473-80.
- 2) García GE. Placas y pápulas urticariales pruriginosas de la gestación. Estudio sobre su fisiopatogenia. Tesis. 1997.
- 3) Lawley TJ, Hertz KC, Wade TR, Ackerman AB, et al. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *JAMA* 1979; 241:1696-99.
- 4) Alcalay J, Wolf JE. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy: the enigma and the confusion. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 115.
- 5) García GE, Ahued AR, Arroyo E, Montes de Oca DD, Granados J. Immunology of the cutaneous disorders of pregnancy. *Int J Dermatol* 1999; 38
- 6) Andersen B, Felding C. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 1992; 12: 1-3
- 7) 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.
- 8) Weiss R, Hull P. Familial occurrence of pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 715-7.

- 9) García GE. Dermatosis propias de gestación. En Temas de Medicina Interna Vol II (3). Editorial Interamericana Mc Graw Hill 1995.
- 10) Aractingi S, Berkane N, Bertheau P, Le Goué C, Dausset J, Uzan Serge, Carosella E. Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. Lancet 1998; 352: 1898-901.
- 11) García GE. Andrade MR, Del barco G, Karchmer KS. Padecimientos dermatológicos en el Instituto Nacional de Perinatología. Perinatol y Rep Hum 1995; 9(3):156-60.
- 12) Beckett MA, Goldberg NS. Pruritic urticarial plaques and papules of pregnancy and skin distention. Arch Dermatol 1991; 127:125-6.
- 13) Carli P, Tarocchi S, Mello G, Fabbri P. Skin immune system activation in pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. Int J dermatol 1994;33:884-5.
- 14) Yancey BK, Lazarova Z. Dermatoses of pregnancy. En Cutaneous medicine and surgery Vol 1, pag 365-71. Editores Arndt, Le Boit, Robinson, Wintroub. Saunders 1996.
- 15) Barrenetxea G, Melchor JC, Barbazán MJ, Aranguren G, Rodríguez-Escudero FJ. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. Int J Gynecol Obstet 1990; 33 : 69-72.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- 16)Errickson C, Matus N. Skin disorders of pregnancy. *Am Fam Phys* 1994;15:605-608.
- 17)Ingber G, Alcalay J, Sandbank M. Multiple dermal fibroblasts in patients with pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. A clue to the etiology? *Med Hypotheses*. 1988;26:11-2.
- 18)Azzouzene DA, Gendron MC, Houdayer M, et al. Maternal B lymphocytes specific for paternal histocompatibility antigens are partially deleted during pregnancy. *J Immunol* 1998;161:2677-83.
- 19)Pawles C, Bucaille-Fleury L, Recanati G. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy relationship maternal weight gain and twin or triplet pregnancies (lett). *Arch Dermatol* 1994;130:801-2.
- 20)García GE, Castelazo ME. La piel y el embarazo. En: *Encycl Med Chir. Gynecologie* 5038-A-10,1997: 1-8.
- 21)Goodall J. Immunofluorescence biopsy for pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy (carta). *J Am Acad Dermatol* 1990;22:322.
- 22)Saurat JH. Immunofluorescence biopsy for pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. Carta. *J Am Acad Dermatol* 1989; 4: 711.
- 23)Bernstein S, Blumberg G. Pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *J Am Podiatr Med Assoc*; 1995;85(10): 560-1.

- 24)Wegman Tg, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is succesful pregnancy a TH2 phenomenon? *Inmunol Today* 1993; 14(7):353-6
- 25)Tangri S, Wegmann Tg, Lin H, Raghupathy R. Maternal antiplacental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Inmunol* 1994; 152: 4903-11
- 26)Lin H, Mosmann Tr, Guilbert L, Tuntipopipat L, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal fetal interface. *J Inmunol* 1993; 151: 4562-5
- 27)Gordon JR, Burd PR Galli SJ, Mast cell as source of multifunltional cytokines. *Inmunol Today* 1990;11(12)
- 28)Okayama Y, Semper A, Holgate ST, Curch Mk. Multiple cytokine mRNA expression in human mast cells stimulated via Fc epsilon RI. *Int Arch Allergy Inmunol* 1995; 107: 158-9.
- 29)Dunham Y, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7237-41.
- 30)Kelin J. Origin of the histocompatibility complex polymorphism the trans-species hypothesis. *Hum Inmunol* 1987; 19:155-62.

- 31) Medearis AL: Immunology of pregnancy. In: essentials of obstetrics and gynecology. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders 1992: 74-81.