

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

*Fundada en 1551*

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE POST GRADO**



**Tesis**

**Digitales UNMSM**

**ANÁLISIS DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR AUTOANTICUERPOS EN  
HERPES GESTACIONAL.**

**UTILIDAD DEL IMMUNOBLOTTING USANDO UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN  
REPRESENTANDO A UN DOMINIO EXTRACELULAR DEL ANTIGENO DE  
PENFIGOIDE AMPOLLAR 180 KD.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

Para optar el Título Profesional de  
**ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

**AUTOR**

**HECTOR MURAKAMI SHIGUEKAWA**

**LIMA – PERÚ  
1999**

Trabajo de Investigación publicado en el *Journal of Dermatological Science* 13 (1996) 112-117, Elsevier Science Ireland Ltd.

Coautores:

**Masayuki Amagai**

Departamento de Dermatología, Escuela de Medicina de la Universidad de Keio, Tokio, Japón.

**Mari Higashiyama**

Departamento de Dermatología, Escuela de Medicina de la Universidad de Osaka, Osaka, Japón.

**Koji Hashimoto**

Departamento de Dermatología, Escuela de Medicina de la Universidad de Osaka, Osaka, Japón.

**Tadeusz P. Chorzelski**

Clínica Dermatológica A.M., Varsovia, Polonia.

**Balbir S. Bhogal**

Departamento de Dermatopatología, Instituto de Dermatología de St. John, Hospital de St. Thomas, Londres, Inglaterra.

**Rachel E. Jenkins**

Departamento de Dermatopatología, Instituto de Dermatología de St. John, Hospital de St. Thomas, Londres, Inglaterra.

**Martin M. Black**

Departamento de Dermatopatología, Instituto de Dermatología de St. John, Hospital de St. Thomas, Londres, Inglaterra.

**Detlef Zillikens**

Departamento de Dermatología, Universidad de Wuerzburg, Wuerzburg, Alemania.

**Takeji Nishikawa**

Departamento de Dermatología, Escuela de Medicina de la Universidad de Keio, Tokio, Japón.

**Takashi Hashimoto**

Departamento de Dermatología, Escuela de Medicina de la Universidad de Keio, Tokio, Japón.

Agradecimiento a:

Takeji Nishikawa; Departamento de Dermatología del Hospital Universitario de Keio, Tokio, Japón.

Takashi Hashimoto; Laboratorio de Investigación de Enfermedades Ampollares - Departamento de Dermatología del Hospital Universitario de Keio, Tokio, Japón.

JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY.

MIS QUERIDOS PADRES Y HERMANOS.

# **INDICE**

- I. ABSTRACTO
- II. INTRODUCCION
- III. MATERIALES Y METODOS
- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSION
- VI. ANEXOS
- VII. BIBLIOGRAFIA

## I. ABSTRACTO

*Herpes gestacional* (HG) es una enfermedad poco frecuente asociada al embarazo. El objetivo de esta investigación fue comparar varias técnicas inmunohistoquímicas e inmunobioquímicas con respecto a su sensibilidad diagnóstica para HG. Nosotros examinamos 43 sueros de HG; solamente la mitad de éstos reaccionó con la zona de la membrana basal (ZMB) tanto con inmunofluorescencia indirecta (IF) como con IF del complemento de piel humana normal, el 81% de los sueros reaccionó con el lado epidérmico de piel seccionada con NaCl 1 M. En general, los títulos de anticuerpos anti-ZMB en los sueros de HG fueron menores que aquellos en los sueros de penfigoide ampollar (PA). El análisis de inmunoblot de extractos epidérmicos humanos mostró que el 51% de los sueros de HG reconocía al antígeno PA 180 kD (PA180) y el 26% reconocía al antígeno PA 230 kD (PA230). Igualmente examinamos la reactividad de los sueros de HG con proteínas de fusión representando al dominio NC16a del PA180 humano o la región terminal C del PA230 del ratón. Mientras el 79% de los sueros de HG reaccionó con la proteína de fusión PA180, solamente el 5% reconoció la proteína de fusión PA230. Nuestros resultados sugieren que la IF indirecta de piel seccionada con NaCl 1 M y el inmunoblotting de una proteína de fusión representando al dominio NC16a del PA180 son técnicas más sensibles para el diagnóstico de HG que la IF indirecta convencional e IF del complemento o el inmunoblotting de extractos epidérmicos crudos.

*Palabras claves:* Autoantígeno; Penfigoide ampollar; *Herpes gestacional*; Inmunoblotting; Proteína de fusión.

## II. INTRODUCCION

*Herpes gestacional* (HG) es una enfermedad ampollar autoinmune poco frecuente asociada al embarazo [1,2], la cual es semejante clínica e inmunológicamente al penfigoide ampollar (PA). Inmunopatológicamente, HG se caracteriza por la unión en vivo de C3 e inmunoglobulina G (IgG) en la zona de la membrana basal (ZMB) y por el factor HG circulante [3], el cual se ha demostrado ser el anticuerpo anti-BMZ IgG fijador de complemento [4]. Los anticuerpos de HG preferentemente reaccionan con el antígeno PA 180 kD (PA180) [5] y ocasionalmente con el antígeno PA 230 kD (PA230) [6]. Estudios recientes usando proteínas recombinantes han indicado que los autoanticuerpos en sueros de PA y HG reconocen un epítoto común en el dominio NC16a extracelular del PA180, tanto por immunoblotting [7] como por inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) [8]. Este dominio se localiza justo al costado de la porción transmembranosa de la proteína.

La reactividad de los sueros de HG con la ZMB es usualmente muy débil. Además, estudios comparativos de diferentes tests diagnósticos para HG han sido difíciles de realizar por la poca frecuencia de la enfermedad. En este estudio, nosotros recolectamos 43 sueros de HG, el mayor número hasta ahora estudiado, y comparamos varios tests serológicos con respecto a su sensibilidad diagnóstica para HG. Nosotros realizamos inmunofluorescencia indirecta (IF) e IF del complemento usando tanto piel normal como piel seccionada con NaCl 1 M, y también ensayos de immunoblot usando extractos epidérmicos humanos y proteínas de fusión representando al PA180 y PA230.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 1. Sueros

Los sueros fueron obtenidos de 43 pacientes con HG, 13 pacientes con BP, 5 pacientes con pénfigo vulgar (PV), 5 con pénfigo foliáceo (PF), y 10 voluntarios normales. El diagnóstico de HG fue hecho por características típicas clínicas, histopatológicas e inmunopatológicas [1,2]. En todos los casos, la IF directa de la biopsia de piel mostró depósito de C3 a lo largo de la ZMB; además, se encontró depósitos de IgG en algunos casos. En todos los sueros de PA, se detectó anticuerpos anti-ZMB circulantes con IF indirecta usando secciones de piel humana normal como sustrato. Los títulos variaron desde 1:40 hasta 1:5120. Los sueros fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso; durante los experimentos, los sueros fueron guardados a  $4^{\circ}\text{C}$  en presencia de  $\text{NaN}_3$  0.1% por menos de un mes.

#### 2. Inmunofluorescencia

Se realizó IF indirecta de secciones de piel humana normal por el método estándar e IF del complemento para la detección del factor HG de acuerdo a un procedimiento previamente reportado [9]. Además, se realizó la IF indirecta e IF del complemento usando como sustrato piel humana normal seccionada con  $\text{NaCl}$  1 M [10].

### 3. Análisis de inmunoblot

Se realizó inmunoblotting de extractos de epidermis humana normal, separada con ácido etileno-diamino tetraacético (EDTA), como se ha descrito previamente [11,12].

Recientemente nosotros hemos expresado una proteína de fusión conteniendo al dominio NC16a entero del PA180 (Matsumura et al., Arch. Dermatol. Res., in press). En resumen, nosotros preparamos modelos de acuerdo a la información de la secuencia reportada por Giudice et al. [13]; el ADNc que codifica al dominio NCI6a fue amplificado por la reacción en cadena polimerasa (PCR) usando como modelo la información del ADNc de un queratinocito humano, y fue subclonado hacia el vector pGEX-2T (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La producción de la proteína de fusión fue inducida por adición de isopropyl- $\beta$ -tiogalacto-pyranoside.

Nosotros hemos reportado previamente la reactividad del suero de PA con la proteína de fusión que codifica al dominio terminal C del PA230 del ratón [14,15]. En la presente investigación, para producir la proteína de fusión más eficientemente, nosotros subclonamos el BPM 1 en pGEX-3X. Estas proteínas de fusión fueron usadas para inmunoblotting, como previamente se ha reportado [11].



## IV. RESULTADOS

### 1. Inmunofluorescencia indirecta

Con la IF indirecta estándar de secciones de piel humana normal, 24 (56%) de los 43 sueros de HG mostraron anticuerpos anti-ZMB IgG en un título de 1:10 a 1:40, excepto para un caso con un título de 1:160. Los 19 sueros de HG restantes fueron negativos con IF indirecta estándar; con IF indirecta de piel humana seccionada con NaCl 1 M, nosotros encontramos 35 (81%) sueros de HG reaccionar con el lado epidérmico en un título de 1:20. Todos los 13 sueros control de PA reaccionaron con la ZMB tanto en piel normal como en piel seccionada con NaCl 1M. Los sueros de pacientes con PV o PF y de voluntarios sanos no revelaron anticuerpos anti-MZB.

### 2. Inmunofluorescencia del complemento

Los anticuerpos anti-BMZ fijadores de complemento (factor HG) estuvieron presentes en 22 (51%) de los 43 sueros de HG con IF complemento usando piel humana normal; con IF complemento de piel seccionada con NaCl 1 M, 23 (53%) sueros de HG mostraron un factor HG reactante con el lado epidérmico de la sección (Figura 1). Los anticuerpos fijadores de complemento fueron igualmente detectados en 9 (69%) y 8 (62%) de los 13 sueros de PA con piel normal y seccionada con

NaCl 1M, respectivamente. Ninguno de los otros sueros control mostró esta reactividad. Los resultados de los estudios de IF se resumen en la Tabla 1.

### 3. Inmunoblotting de extractos epidérmicos

Con inmunoblotting de extractos epidérmicos humanos, 11 (26%) de los 43 sueros HG reaccionaron con el PA230 y 22 (51%) con el PA180 (Figura 2, Tabla 2); 10 (77%) y 11 (85%) de los 13 sueros de PA reaccionaron fuertemente con el PA230 y PA180, respectivamente. Ninguno de los otros sueros control mostró ninguna reactividad específica.

### 4. Inmunoblotting de proteínas de fusión

La proteína de fusión contenía al dominio NC16a del PA180 de 77 aminoácidos (números de nucleótidos desde 1573 hasta 1803 [13]). Esta proteína de fusión fue reconocida por 34 (79%) de 43 sueros de HG y por 12 (92%) de 13 sueros de PA. Ninguno de los otros sueros control reaccionó con esta proteína de fusión (Figura 3, Tabla 2). Aunque la proteína de fusión del dominio terminal C del PA230 fue reconocida por 8 (62%) sueros de PA, solamente 2 (5%) sueros de HG reaccionaron débilmente con la proteína de fusión (Tabla 2). Ninguno de los otros sueros control reaccionó con la proteína de fusión.

## V. DISCUSION

En esta investigación, nosotros analizamos autoanticuerpos en los sueros de 43 pacientes con HG, cuyo diagnóstico fue confirmado por características clínicas típicas y unión en vivo de C3 a lo largo de la ZMB. Con IF indirecta de piel humana normal, los sueros de HG tuvieron títulos mucho más bajos de anticuerpos anti-ZMB, comparados con títulos de sueros de PA. En el presente estudio, los anticuerpos anti-ZMB fueron detectados en sólo 56% de los sueros de HG en un título menor a 1:40. Estos hallazgos son consistentes con reportes previos [16,17] en los que los anticuerpos anti-ZMB fueron negativos o detectados en un título bajo.

Shornick [16] sugirió que el depósito de complemento a lo largo de la ZMB cutánea es el “sine qua non” para el diagnóstico de HG y es demostrable en todos los casos de HG esencialmente. Nuestros resultados confirmaron plenamente esta observación en HG. El factor HG, sin embargo, fue detectado en solamente alrededor de la mitad de los sueros de HG con IF del complemento usando tanto piel normal como la seccionada con NaCl 1 M. Este resultado fue de alguna manera inesperado ya que estudios previos han señalado que la IF del complemento es un test bastante sensible para el diagnóstico de HG [9]. Sin embargo, la sensibilidad de nuestra técnica de IF del complemento resultó ser suficientemente sensible, ya que el 69% de los sueros de PA mostraron igualmente reactividad positiva a la IF del complemento. En contraste, la

IF indirecta de piel seccionada con NaCl 1M probó ser un método más sensible y detectó anticuerpos anti-ZMB en 81% de los sueros de HG, sugiriendo que esta técnica igualmente debería ser útil en el diagnóstico de HG.

Con el immunoblotting de extractos epidérmicos humanos normales, los sueros de HG reaccionaron más frecuentemente con PA180 que con PA230. Esto confirma un reporte previo [5] que el PA180 es el mayor antígeno en HG. Recientemente, Kirtschig et al. [18] reportaron un caso severo de HG con anticuerpos IgG que se unían a una proteína 200 kD en extractos epidérmicos, aunque esta proteína no fue caracterizada posteriormente. Nuestro estudio no mostró reactividad específica con ninguna proteína de alrededor de 200 kD en ningún suero de HG.

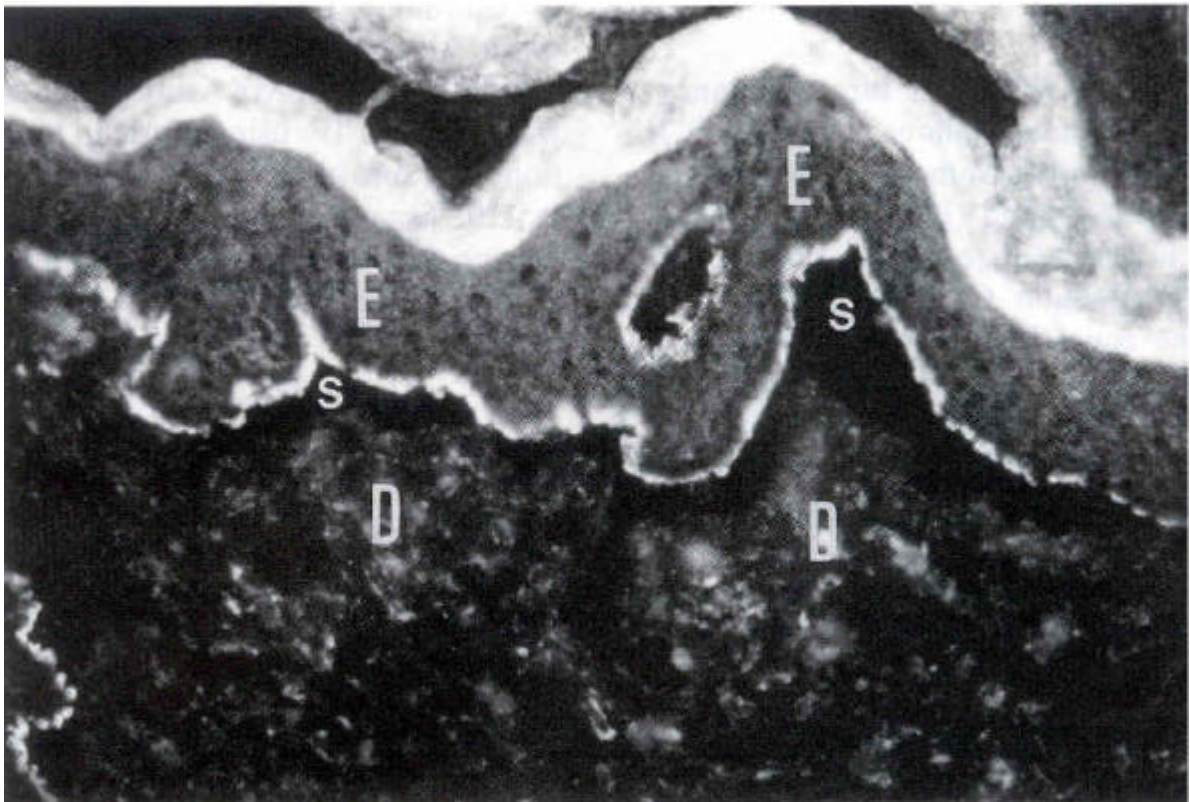
El immunoblotting, usando una proteína de fusión conteniendo al dominio NC16a del PA180, mostró ser muy sensible y específico. Mientras que ninguno de los sueros de pénfigo y control normal mostró reactividad positiva, el 79% de los sueros de HG reaccionó con esta proteína de fusión. Este número fue comparable con los resultados de la IF de piel seccionada con NaCl 1 M. Nosotros creemos, sin embargo, que el immunoblotting de esta proteína de fusión es superior a la IF para el diagnóstico de HG, porque mostró bandas de proteína claras y distintivas en los blots, comparado con la reactividad relativamente débil con el lado epidérmico por IF. Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis previa que los autoanticuerpos contra este sitio antigénico bien definido en el ectodominio PA180 podrían jugar un rol importante en la patogénesis de HG [7,8, 19].

Aunque PA230 fue detectado por 26% de los sueros de HG con inmunoblotting de extractos epidérmicos, solamente 5% de los sueros detectó una proteína de fusión conteniendo al dominio terminal C de PA230. Esto podría explicarse por el bajo título de anticuerpos anti-PA230 en los sueros de

HG. Por otro lado, previamente [15] y en este estudio, se ha mostrado que la mitad de los sueros de PA detectó esta proteína de fusión. Así, la menor reactividad de los sueros de HG con PA230 podría indicar alguna diferencia en la fisiopatología entre PA y HG.

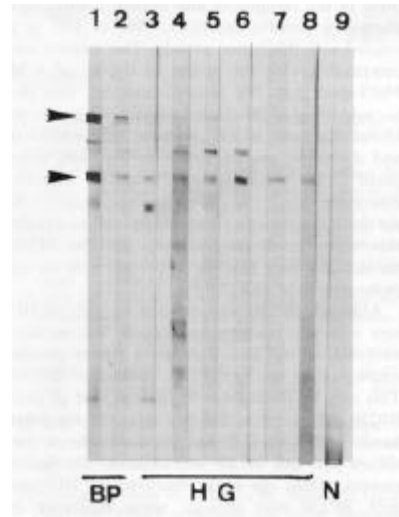
En conclusión, para confirmar un diagnóstico de HG usando sueros, la IF indirecta de piel seccionada con NaCl 1M y el inmunoblotting usando una proteína de fusión conteniendo al dominio NC16a del PA180 parecen ser las técnicas más sensibles para el diagnóstico de HG. Particularmente, la proteína de fusión PA180 debería ser útil si se aplicara a una técnica más conveniente, tal como un ELISA, en el futuro. Sin embargo, nosotros queremos resaltar la importancia de la IF directa en el sustento del diagnóstico en HG.

## VI. ANEXOS



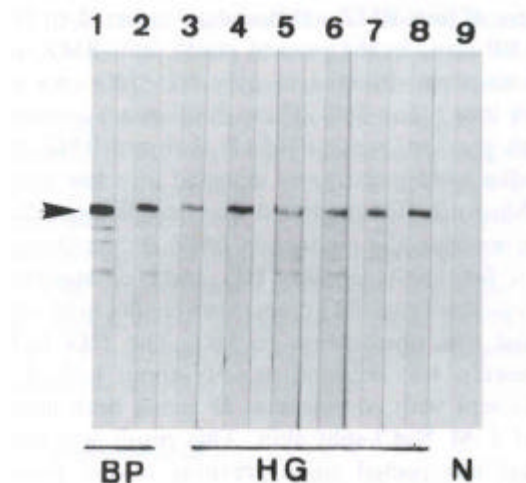
**Figura 1. IF del complemento de piel humana seccionada con NaCl 1  
M**

El suero de este paciente con HG mostró reactividad con el lado epidérmico de la sección. “E”, “S” y “D” indican la epidermis, la región seccionada y la dermis, respectivamente.



**Figura 2. Inmunoblotting de extractos epidérmicos humanos**

La mayoría de los sueros de HG reaccionó preferentemente con el PA180, y solamente algunos sueros de HG débilmente con el PA230 (tiras 3 - 8). Dos sueros control de PA reaccionaron fuertemente tanto con el PA230 como también con el PA180 (tiras 1 y 2). Un suero normal no mostró reactividad (tira 9). Las flechas superior e inferior de la izquierda indican las posiciones del PA230 y PA180, respectivamente.



**Figura 3. Inmunoblotting de la proteína de fusión NC16a del PA180**

Dos sueros de PA (tiras 1 y 2) y 6 sueros de HG (tiras 3 - 8) reaccionaron con la proteína de fusión. Un suero normal no reveló reactividad (tira 9). La flecha de la izquierda indica la posición de la proteína de fusión.

**TABLA 1**  
**RESULTADOS DE ESTUDIOS DE**  
**INMUNOFLUORESCENCIA**

Sueros	Número	Piel normal		Piel seccionada con NaCl 1 M	
		IFI <sup>a</sup>	IFC <sup>b</sup>	IFI	IFC
HG	43	24 (56%)	22 (51%)	35 (81%)	23 (53%)
PA	13	13 (100%)	9 (69%)	13 (100%)	8 (62%)
PV	5	0	0	0	0
PF	5	0	0	0	0
Normal	10	0	0	0	0

<sup>a</sup> IF Indirecta

<sup>b</sup> IF del Complemento



## TABLA 2

### RESULTADOS DE ESTUDIOS DE IMMUNOBLOT

Sueros	Número	Extracto epidérmico		Proteínas de fusión	
		PA230	PA180	PA180 NC16a	PA230 terminal C
HG	43	11 (26%)	22 (51%)	34 (79%)	2 (5%)
PA	13	10 (77%)	11 (85%)	12 (92%)	8 (62%)
PV	5	0	0	0	0
PF	5	0	0	0	0
Normal	10	0	0	0	0

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Schaumburg-Lever G, Safford OE, Orfanos CE, Lever WF: Herpes gestationis: histology and ultrastructure. Arch Dermatol 107: 888-892, 1973.
2. Shornick JK, Bangert JL, Freeman RG, Gilliam JN: *Herpes gestationis*: clinical and histologic features of twenty-eight cases. J Am Acad Dermatol 8: 214-24, 1983.
3. Jordon RE, Heine KG, Tappeiner G et al.: The immunopathology of *Herpes gestationis*. Immunofluorescence studies and characterization of 'HG factor'. J Clin Invest 57: 1426-1431, 1976.
4. Katz SI, Hertz K, Yaoita H: *Herpes gestationis*. Immunopathology and characterization of the HG factor. J Clin Invest 57: 1434-1441, 1976.
5. Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Diaz LA, Anhalt GJ: *Herpes gestationis* autoantibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen. J Clin Invest 87: 2023-2026, 1988.
6. Kelly SE, Bhogal BS, Wojnarowska F, Whitehead P, Leigh IM, Black MM: Westem blot analysis of the antigen in pemphigoid gestationis. Br J Dermatol 122: 445- 449, 1990.
7. Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA: Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. J Immunol 151: 5742-50, 1993.
8. Giudice GJ, Wilske KC, Anhalt GJ, Fairley JA, Taylor AF, Emery DJ, Hoffman RG, Diaz LA: Development of an ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. J Invest Dermatol 102: 878-881,1994.

9. Hodge L, Black MM, Ramnarain N, Bhogal BS: Indirect complement immunofluorescence in the assessment of bullous pemphigoid, cicatricial pemphigoid and herpes gestationis. *Clin Exp Dermatol* 3: 61-67, 1978.
10. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO, Queen LL, Wheeler CE: Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride separated skin. *J Invest Dermatol* 82: 139-144, 1984.
11. Hashimoto T, Ogawa MM, Konohana A, Nishikawa T: Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 94: 327-331, 1990.
12. Sugi T, Hashimoto T, Hibi T, Nishikawa T. Production of human monoclonal anti-basement membrane zone (BMZ) antibodies from a patient with bullous pemphigoid (BP) by Epstein-Barr virus transformation. Analysis of the heterogeneity of anti-BMZ antibodies in BP sera using them. *J Clin Invest* 84: 1050-1055, 1989.
13. Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen, BP-180. *J Invest Dermatol* 99: 243-250, 1992.
14. Amagai M, Hashimoto T, Tajima S, Inokuchi Y, Shimizu N, Saito M, Miki K, Nishikawa T: Partial cDNA cloning of the 230-kD mouse bullous pemphigoid antigen by use of a human monoclonal anti-basement membrane zone antibody. *J Invest Dermatol* 95: 252-259, 1990.
15. Tanaka M, Hashimoto T, Amagai M, Shimizu N, Ikegami N, Tsubata T, Hasegawa A, Miki K, Nishikawa T: Characterization of bullous pemphigoid antibodies by use of recombinant bullous pemphigoid antigen proteins. *J Invest Dermatol* 97: 725-728, 1991.

16. Shornick JK: Herpes gestationis. J Am Acad Dermatol 17: 539-556,1987.
17. Bushkell LL, Jordon RE, Goltz RW: Herpes gestationis: new immunologic findings. Arch Dermatol 110: 65-69, 1974.
18. Kirtschig G, Collier PM, Emmerson RW, Wojnarowska F: Severe case of pemphigoid gestationis with unusual target antigen. Br J Dermatol 131: 108-11, 1994.
19. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ: A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. J Clin Invest 92: 2480-2488, 1993.