

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°C hasta su uso; durante los experimentos, los sueros fueron guardados a 4°C en presencia de 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 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- β -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].