

Departamento de Dermatología
CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA



PAPEL DE LAS ISOFORMAS HER Y LA
mTOR EN LA ACANTÓLISIS
DEL PÉNFIGO VULGAR EN UN
MODELO MURINO

Memoria presentada por Dña.
Maidel Pretel Irazabal para aspirar
al grado de Doctor en Medicina
por la Universidad de Navarra.

Pamplona. Septiembre de 2009.

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra

ISBN 84-8081-083-1

El presente trabajo titulado **“Papel de las isoformas HER y la mTOR en la acantólisis del pénfigo vulgar en un modelo murino”** presentado por Dña. Mainer Pretel Irazabal, ha sido realizado bajo nuestra dirección y co-dirección en el Departamento de Dermatología de la Clínica Universidad de Navarra y en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Navarra, y consideramos que tiene la debida calidad para su defensa y calificación.

Pamplona, Septiembre de 2009.

VºBº del Director del trabajo

Pamplona, Septiembre de 2009.

VºBº del co-Director del trabajo

Dr. Agustín España

Dra. Maria Jesús Lopez-Zabalza

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de la beca FIS PI050074 del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.

Esta Tesis es el resultado de un laborioso esfuerzo a lo largo de varios años. No hubiese sido posible llevarlo a cabo sin el apoyo de un numeroso grupo de compañeros.

Quisiera agradecer especialmente al Dr. Agustín España, mi director de tesis, el tiempo dedicado en este proyecto y todos los conocimientos que me ha transmitido en el mundo de la investigación y la Dermatología.

También desearía agradecer a mi co-directora de Tesis, la Dra. María Jesús Lopez-Zabalza, por su aportación de conocimientos en Bioquímica, su disponibilidad y amabilidad.

A la Universidad de Navarra y a la Clínica Universidad de Navarra, por haberme formado como médico y especialista.

A todas las personas del Departamento de Dermatología, que han sido como mi familia durante todo este tiempo. A mis compañeros residentes Julio del Olmo, Miren Marquina, Leyre Aguado, Gorka Ruiz-Carrillo, Laura Marqués y María Navedo a los que además de compañeros de trabajo considero amigos.

A los Doctores Pedro Redondo, Pilar Gil, Ignacio Sánchez-Carpintero y Pedro Lloret por todo lo que me han enseñado durante este tiempo.

Al personal no médico del Departamento, cuyo apoyo y cariño para han sido mí fundamentales: gracias Carmen Elarre, Soledad Solchaga, Marina Sanz, Gloria Soriano y Beatriz Armendáriz.

A Estibaliz Galdeano y Ana Zazpe, secretarias de Dermatología, por su ayuda en el mecanografiado de la tesis y por su disponibilidad.

A las personas del laboratorio de Bioquímica que tanto me han ayudado, sobre todo a Teresa y Adela, por su disponibilidad y paciencia.

A todos los que trabajan en la Unidad de Morfología e Imagen del CIMA que me han facilitado el trabajo en un terreno tan desconocido para mí.

A mi familia, sobre todo a mis padres, por todo el esfuerzo personal que han realizado para que yo me haya formado académicamente y como persona.

A todos mis amigos, por los buenos momentos que me han hecho pasar durante todo este tiempo.

ABREVIATURAS

Ach: acetilcolina

Akt : proteína kinasa B

anti-Dsg: anticuerpo anti-desmogleína

anti-PX: anticuerpos anti-pemfaxina

AR: anfiregulina

ATP: adenosín trifosfato

BTC: betacelulina

dl: decilitro

Dsg1: desmogleína 1

Dsg3: desmogleína 3

Dsc: desmocolinas

DP: desmoplaquina

DNA: *deoxyribonucleic acid*

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMEA: *Medicinal Evaluation Agency*

eNOS: isoenzima endotelial de la óxido nítrico sintasa

EPR: epirregulina

ErbB-1: *epidermal growth factor receptor* isoforma 1

ErbB-2: *epidermal growth factor receptor* isoforma 2

ErbB-3: *epidermal growth factor receptor* isoforma 3

ErbB-4: *epidermal growth factor receptor* isoforma 4

FDA: *Food and Drug Administration*

g: gramo

G: gauge

HB-EGF: *heparin binding epidermal growth factor-like*

HE: hematoxilina-eosina

HER-1: *epidermal growth factor receptor* isoforma 1

HER-2: *epidermal growth factor receptor* isoforma 2

HER-3: *epidermal growth factor receptor* isoforma 3

HER-4: *epidermal growth factor receptor* isoforma 4
HLA: complejo de histocompatibilidad humano
IFD: inmunofluorescencia directa
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IgA: inmunoglobulina A
IgG: inmunoglobulina G
IgE: inmunoglobulina E
IgG-PV: inmunoglobulina G purificada de paciente con pénfigo vulgar
IgG-SN: inmunoglobulina G purificada de paciente sano
IHQ: inmunohistoquímica
IL: interleuquina
iNOS: isoenzima inducible de la óxido nítrico sintasa
kD: kilodaltons
kg: kilogramo
M: molar
MAchR: receptores muscarínicos de la acetil colina
mg: miligramo
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
NAchR: receptores nicotínicos de la acetil colina
nNOS: isoenzima neuronal de la óxido nítrico sintasa
NRG: neuroregulina
NOS: óxido nítrico sintasa
p-Akt: akt fosforilada
p-HER1: *epidermal growth factor receptor* isoforma 1 fosforilada
p-HER2: *epidermal growth factor receptor* isoforma 2 fosforilada
p-HER3: *epidermal growth factor receptor* isoforma 3 fosforilada
p-mTOR: mTOR fosforilada
p-Src: Src fosforilada
PA: activador del plasminógeno
PF: pénfigo foliáceo
PG: placoglobina
PI3K: fosfatidil inositol 3-kinasa
PKC: proteína-quinasa C
PLC: fosfolipasa C

PV: pénfigo vulgar

PX: pemfaxina

rIL-2s: factor soluble del receptor de la IL-2

SIE: sustancia intercelular

SNP: *single nucleotide polymorphisms*

Th₁: linfocitos T helper 1

Th₂: linfocitos T helper 2

TGF- α : *transforming growth factor- α*

TK: tirosín kinasa

tPA: activador tisular del plasminógeno

UPA: *urokinase-type plasminogen activator*

UPAR: receptor del *urokinase-type plasminogen activator*

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Enfermedades ampollosas cutáneas	3
1. 2. Pénfigo vulgar	3
1. 2. 1. Definición.....	3
1. 2. 2. Epidemiología	4
1. 2. 2. 1. Factores genéticos.....	4
1. 2. 2. 2. Otros factores	6
1. 2. 3. Etiopatogenia	6
1. 2. 3. 1. Antígenos del PV.....	10
1. 2. 3. 2. Inmunidad humoral.....	14
1. 2. 3. 3. Inmunidad celular.....	15
1. 2. 3. 4. Mecanismos potenciadores de la enfermedad.....	17
1. 2. 3. 5. Mecanismos moleculares.....	18
1. 2. 3. 6. Apoptosis.....	26
1. 2. 4. Teorías sobre la etiopatogenia del PV.....	27
1. 2. 4. 1. Teoría compensatoria (<i>Desmoglein Compensation Theory</i>).....	28
1. 2. 4. 2. Teoría proteolítica.....	29
1. 2. 4. 3. Teoría de la disrupción física (<i>Steric Hindrance Theory</i>).....	29
1. 2. 4. 4. La hipótesis “encogimiento de las células basales”.....	30
1. 2. 4. 5. Teoría de las múltiples vías patogénicas de señalización (<i>Multiple Hit Theory</i>).....	31
1. 2. 5. Manifestaciones clínicas	31
1. 2. 6. Diagnóstico	39
1. 2. 6. 1. Histopatología.....	40
1. 2. 6. 2. Inmunofluorescencia indirecta y directa	40
1. 2. 6. 3. <i>Immunoblot</i> e inmunoprecipitación	44
1. 2. 6. 4. <i>ELISA</i>	44
1. 2. 7. Tratamiento.....	45

2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
3. 1. Obtención de los sueros.....	57
3. 2. Caracterización de los sueros.....	58
3. 2. 1. Inmunofluorescencia indirecta	58
3. 2. 2. <i>ELISA</i>	58
3. 2. 3. Inmuprecipitación	58
3. 3. Purificación de IgG	61
3. 4. Modelo de experimentación animal.....	62
3. 5. Experimentos de transferencia pasiva.....	62
3. 6. Administración de inhibidores.....	63
3. 6. 1. Erlotinib	64
3. 6. 2. Rapamicina	65
3. 6. 3. PP1 (4-Amino-1- <i>tert</i> -butil-3-(1'-naftil)pirazolo [3,4-d]pirimidina)	66
3. 6. 4. Inhibidor de la caspasa II (cpm-VAD-CHO)	66
3. 7. Hematoxilina-eosina	67
3. 8. Inmunofluorescencia directa	67
3. 9. Inmunofluorescencia indirecta	68
3. 10. Inmunohistoquímica.....	68
3. 11. Técnica TUNEL	70
3. 12. Análisis de las imágenes	71
3. 13. Análisis estadístico	71
4. RESULTADOS.....	73
4. 1. Test de patogenicidad de las fracciones IgG de los sueros de los pacientes en los ratones C57	75
4. 1. 1. Administración de fracciones IgG de suero control (IgG-SN)	75
4. 1. 2. Administración de fracciones IgG de suero de pacientes con PV (IgG-PV)	75
4. 2. Estudio de la participación de los receptores HER y sus ligandos en el PV.	76
4. 2. 1. Administración de fracciones IgG de suero control (IgG-SN)	76
4. 2. 2. Administración de fracciones IgG de suero de PV (IgG-PV)	76

4. 3. Estudio de la participación de las vías de señalización intracelular activadas por los receptores HER en el PV	76
4. 3. 1. Administración de fracciones IgG de suero control (IgG-SN)	77
4. 3. 2. Administración de fracciones IgG de suero de PV (IgG-PV)	77
4. 4. Pretratamiento con inhibidores de los ratones.....	77
4. 4. 1. Pretratamiento con erlotinib e inyección de fracciones de IgG-SN e IgG-PV.....	77
4. 4. 1. 1. Inyección de IgG-SN y erlotinib.....	78
4. 4. 1. 2. Inyección de IgG-PV y erlotinib	78
4. 4. 2. Pre-tratamiento con rapamicina e inyección de fracciones de IgG-SN e IgG-PV	79
4. 4. 2. 1. Inyección de IgG-SN y rapamicina	79
4. 4. 2. 2. Inyección de IgG-PV y rapamicina	79
4. 4. 3. Pretratamiento con PP1 e inyección de fracciones de IgG-SN e IgG-PV.....	80
4. 4. 3. 1. Inyección de IgG-SN y PP1	80
4. 4. 3. 2. Inyección de IgG-PV y PP1	80
4. 5. Estudio de la apoptosis en el PV	81
4. 5. 1. Cronología de la apoptosis	81
4. 5. 2. Estudio de la apoptosis con IgG-SN e IgG-PV	81
4. 5. 3. Estudio de la apoptosis con inhibidores.....	81
4. 5. 3. 1. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y erlotinib.....	81
4. 5. 3. 2. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y rapamicina	81
4. 5. 3. 3. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y PP1 ...	82
4. 5. 3. 4. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV e inhibidor pan-caspasa.....	82
5. DISCUSIÓN	107
5. 1. Experimentos de transferencia pasiva en un modelo murino	109
5. 2. Hallazgos de los experimentos	112
6. CONCLUSIONES	125

7. BIBLIOGRAFÍA	129
8. ANEXO 1	151
9. ANEXO 2	153

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Enfermedades ampollosas cutáneas

Según la clasificación propuesta por Diaz y Giudice (Díaz and Giudice, 2000) las enfermedades ampollosas cutáneas se dividen en dos grandes grupos: las debidas a trastornos genéticos o genodermatosis y las de origen autoinmune (caracterizadas por la producción de autoanticuerpos circulantes, fundamentalmente de clase IgG, frente a distintos antígenos de las uniones intercelulares o de la unión dermo-epidérmica). Las genodermatosis suelen manifestarse en el nacimiento o en periodo neonatal, mientras que las autoinmunes pueden hacerlo en cualquier etapa de la vida. Las enfermedades ampollosas autoinmunes se clasifican a su vez dependiendo del plano de localización de la ampolla, en intraepidérmicas y subepidérmicas (**Tabla 1**).

ENFERMEDAD	ANTÍGENO
<u>Intraepidérmicas</u>	
-Pénfigo superficial: *Pénfigo foliáceo *Pénfigo eritematoso *Pénfigo foliáceo endémico o Fogo Selvagem	Dsg1 Dsg1 Dsg1
-Pénfigo profundo: *Pénfigo vulgar *Pénfigo vegetante	Dsg3 o Dsg3+Dsg1 Dsg3+Dsg1
-Pénfigo paraneoplásico	Plaquinas
<u>Subepidérmicas</u>	
-Pénfigoide ampolloso -Pénfigoide gestationis -Pénfigoide de mucosas -Dermatitis herpetiforme -Enfermedad IgA lineal	BP180 o BP180+BP230 BP180 o BP180+BP230 BP180, laminina 5, integrina $\alpha 6\beta 4$ Desconocido (transglutaminasa) Antígeno 97 kD

Tabla 1: Clasificación de las enfermedades ampollosas adquiridas (Diaz and Giudice, 2000).

1. 2. Pénfigo vulgar

1. 2. 1. Definición

Se han descrito varios tipos de pénfigo. Todos ellos se encuadran dentro del grupo de enfermedades ampollosas autoinmunes adquiridas. En estas patologías existen autoanticuerpos circulantes que cuando se unen al antígeno diana provocan la activación de

mecanismos no del todo conocidos, que producen la ruptura de los desmosomas (uniones intercelulares) y la separación de los queratinocitos entre sí como resultado final. Esta separación celular se denomina histopatológicamente acantólisis. Todo este proceso clínicamente se manifiesta en los pacientes con la aparición de ampollas/ erosiones en piel y/o mucosas.

La clasificación de los distintos tipos de pénfigo se realiza en función de la localización de la ampolla dentro de la epidermis y se distinguen dos grandes grupos: los pénfigos superficiales, entre ellos el pénfigo foliáceo (PF), y los profundos, entre los que destaca el pénfigo vulgar (PV) (**Tabla 1**). En las formas superficiales la acantólisis se origina en la capa granulosa de la epidermis, mientras que en las formas profundas se localiza en la zona suprabasal (por encima de la capa de queratinocitos basales).

Dentro del PV, a su vez, pueden presentarse lesiones localizadas solamente en cavidad oral (PV mucoso) o aparecer lesiones en las mucosas y también en la superficie cutánea (PV cutáneo-mucoso). Cada una de estas formas tiene un pronóstico y un tratamiento distinto.

1. 2. 2. Epidemiología

La incidencia del PV es baja y variable en función de la población estudiada. Es mucho más frecuente en la población de origen judío. En Jerusalén se estima que su incidencia es de 1´6 casos por cada 100.000 habitantes (Pisanti et al, 1974). En países donde este grupo racial es porcentualmente pequeño como en Finlandia su incidencia no supera los 0´76 casos por 1.000.000 de habitantes (Hietanen et al, 1982). No existen claramente diferencias entre sexos (Rosenberg et al, 1976), aunque en algunos estudios se ha descrito un mayor predominio en mujeres (2:1). La edad de comienzo de sitúa en torno a los 50 y 60 años, aunque no es infrecuente observar la enfermedad en edades más tardías o durante la infancia/adolescencia (Yazganoglu et al, 2006).

1. 2. 2. 1. Factores genéticos

-Complejo mayor de histocompatibilidad

La predisposición que presentan algunas personas para desarrollar la enfermedad puede estar en relación con la presencia de determinados haplotipos de HLA. Concretamente, entre los judíos Askenazi con PV predomina el HLA-DR4 (Ahmed et al, 1990). En otros grupos étnicos afectos de PV, predomina el HLA-DRw6 (Szafer et al, 1987). En un porcentaje elevado de pacientes afectos de PV y con haplotipo DR4 se ha observado dos alelos infrecuentes de este haplotipo como son los denominados DRβ1*0402 y DRβ1*1401 (Lin et

al, 1997). En los pacientes con PV y haplotipo DRw6 en la mayoría de casos se observa el alelo denominado DR β 1*0503.

En un estudio español basado en 26 pacientes afectados de PV, se observó la presencia de HLA-DR4 en 23 de ellos. De estos, el 81% presentaba el alelo DR β 1*0402, frente a sólo un 4% de la población general (Gonzalez-Escribano et al, 1998). En un estudio más reciente, basado en el estudio de varias familias diagnosticadas de PV familiar, se pudo observar que en todos los casos estaba presente el haplotipo HLA-DR4 y –DR14, incluídos también familiares no afectados de enfermedad (Bordel-Gomez et al, 2006).

Parece que también existen alelos protectores como el DQB1*02, el DRB1*0301, DRB1*07 y el DQA1*0501 (Loiseau et al, 2000)

-Inmunoglobulinas

Se ha postulado que el perfil de anticuerpos circulantes en esta enfermedad podría estar determinado genéticamente. En algunos estudios realizados en India y en el norte de Europa se ha visto que hay una diferente proporción de pacientes con anticuerpos anti-Dsg1 (Harman et al, 2000) Por otro lado, sugiere la implicación de factores genéticos la presencia de anticuerpos anti-Dsg en familiares de pacientes diagnosticados de PV (Torzecka et al, 2007). No obstante, el número de casos publicados de pacientes con PV familiar es bajo (Stavropoulus et al, 2001).

Estudios recientes han descrito que la respuesta humoral frente a las Dsgs (Payne et al. 2005) así como el potencial patogénico de la IgG anti-Dsg (Qian et al, 2007) podrían estar condicionada genéticamente.

-Citoquinas

En un estudio reciente se encontró una mayor frecuencia del haplotipo “*low producer*” de interleuquina (IL)-10 en pacientes con PV comparados con controles sanos (Eberhard et al, 2005). Otros estudios han identificado a la IL-4 como un factor crítico derivado de linfocitos T implicado en la patogénesis del PV (Takahashi et al, 2008).

-Autoantígenos

En el año 2000 fueron descritos los SNP (*single nucleotide polymorphisms*) que corresponden a una variación de la secuencia de DNA por el cambio de un único nucleótido (Risch et al, 2000). Más tarde se demostró que el genoma está formado por variantes de SNP unidos físicamente. El gen que codifica la Dsg3 (DSG3) contiene 46 SNPs. En un estudio

publicado recientemente, se muestra una asociación entre 2 SNP y el PV (Capon et al, 2006). Curiosamente, estos 2 SNPs se encontraban en el contexto de alelos de HLA conocidos por conferir susceptibilidad para desarrollar el PV, por lo que se postula el efecto aditivo de los dos *loci*.

1. 2. 2. 2. Otros factores

Son varios los factores que han sido implicados como posibles factores etiopatogénicos en el PV, entre ellos la radiación ultravioleta B (Reis et al, 2000), la radiación ionizante (Aguado et al, 2009), el estrés (Cremniter et al, 1998), determinados fármacos y casos de pénfigo paraneoplásico asociados a tumores. Se han publicado casos de pénfigo inducidos por fármacos como la penicilamina, penicilina (Heymann et al, 2007), captopril y β -bloqueantes. Normalmente, estas formas de PV suelen tener buen pronóstico y desaparecen o mejoran tras retirar el agente inductor del cuadro. Se han publicado algunos casos de PV asociados a infección concomitante con el virus herpes tipo 8 (Memar et al, 1997). Se desconoce si esta asociación es simplemente casual o si es realmente inductora de la enfermedad.

1. 2. 3. Etiopatogenia

El mecanismo por el cual se produce la acantolisis suprabasal en el PV no se comprende totalmente. No obstante, se postula que intervienen factores humorales con producción de autoanticuerpos IgG frente a proteínas estructurales de la epidermis que ponen en marcha señales de transducción intracelular locales. No obstante, para comprender los mecanismos que intervienen en la etiopatogenia del PV a continuación se explicarán la estructura de la piel, los diferentes tipos de unión intercelular y la función que tienen en el mantenimiento de la cohesión epidérmica.

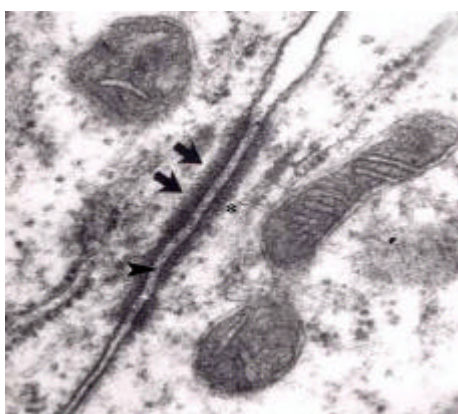
La piel está constituida por 3 capas bien diferenciadas: epidermis, dermis e hipodermis, que le confieren sus diferentes funciones (protección, termorregulación, secreción excreción, sentido del tacto, entre otros). La epidermis es un tejido autorregenerativo, poliestratificado de 120-200 μ de espesor. Consta de 4 ó 5 capas que proceden de la capa basal, y tras multiplicarse y diferenciarse se queratinizan y ascienden para ser eliminadas en la capa más superficial. Las capas, de la más interna a la externa son: capa basal, capa espinosa, capa granulosa y la capa córnea. Las dos primeras corresponden a la epidermis metabólicamente activa (cuerpo mucoso de Malpighio) y las otras tres corresponden a la epidermis metabólicamente inactiva. Este epitelio carece de vasos y nervios, pero contiene dos tipos de

anejos: unos glandulares (glándulas sebáceas y sudoríparas) y otros queratinizados (uñas y pelo).

La epidermis, como todos los tejidos vivos, presenta estructuras especializadas que permiten una correcta unión entre células. Estas uniones son principalmente de cuatro tipos: desmosomas (*maculae adherens*), uniones adherentes (*zonulae adherens*), zonulae ocludens (*tight junctions*) y las uniones *gap* o uniones de contacto. Existen además otras uniones especializadas que permiten la adhesión de la célula epitelial a la membrana basal, entre las que se encuentran los hemidesmosomas y las uniones focales.

Los desmosomas son responsables de la adhesión de queratinocitos. Son las estructuras de adhesión más importantes y numerosas de la epidermis. Están presentes en toda la epidermis, pero aumentan en número y tamaño cuando los queratinocitos van migrando hacia estratos más superficiales. Unen el citoesqueleto de filamentos intermedios de queratina a la membrana celular para mantener la integridad de la célula.

Desde el punto de vista ultraestructural, están formados por dos placas electron-densas intracelulares adheridas al borde interno de la membrana plasmática y unidas entre sí por una banda electrondensa lineal extracelular (desmoglea) localizada entre las dos membranas plasmáticas celulares (**Figura 1**). Los filamentos intermedios de queratina procedentes del interior de la célula se anclan en las placas electrondensas intracelulares a modo de horquillas y posteriormente se doblan y regresan al interior del citoplasma. Otorgan a la célula elasticidad y a la vez resistencia mecánica.



Desmoglea:

- *Desmogleína 1
- *Desmogleína 2
- *Desmogleína 3
- *Desmocolina 1a y 1b
- *Desmocolina 2a y 2b
- *Desmocolina 3a y 3b

Placas intracelulares:

- *Placoglobina
- *Desmoplaquina 1
- *Desmoplaquina 2
- *Desmocalmína
- *Plectina
- *Proteína de banda 6
- *Desmoyoquina

Figura 1: Imagen ultraestructural de un desmosoma. Con dos flechas se señala la placa intracelular y con una cabeza de fecha la desmoglea.

Los desmosomas, desde el punto de vista estructural, están constituidos por distintos tipos de proteínas (**Figura 2**). Básicamente son de dos tipos. El primer tipo son proteínas transmembrana y están formadas por tres dominios (extracelular, trasmembrana e

intracitoplasmático). El segundo tipo son proteínas intracitoplasmáticas y están en íntima cohesión con las primeras.

Las proteínas transmembrana se denominan caderinas y precisan calcio para realizar su función de adhesión. Existen dos tipos de caderinas: caderinas clásicas y caderinas desmosómicas. Las primeras son las proteínas constitutivas de las uniones adherentes. Las caderinas desmosómicas se dividen a su vez en dos tipos: desmogleínas (Dsg) y desmocollinas (Dsc).

Las caderinas desmosómicas son glicoproteínas transmembrana tipo I (región aminoterminal extracelular y región carboxiterminal intracelular) y se caracterizan por presentar cuatro porciones repetidas en su porción extracelular. Las caderinas desmosómicas se diferencian de las caderinas clásicas por la presencia de una porción adicional en su región carboxiterminal.

Existen tres isoformas de desmogleína, cuyos genes están ligados en tándem en el orden Dsg1-Dsg2-Dsg3 desde 5' a 3' en el cromosoma humano 18q21 (Simrak et al, 1995). Cada una tiene un peso molecular diferente: 160 kD la Dsg1 y 130 kD la Dsg3. La Dsg1 y la Dsg3 se encuentran casi exclusivamente en los epitelios estratificados. La Dsg2, en cambio, tiene una expresión más difusa, apareciendo en todos los tejidos que tienen desmosomas, incluido el miocardio (Schafer et al, 1994).

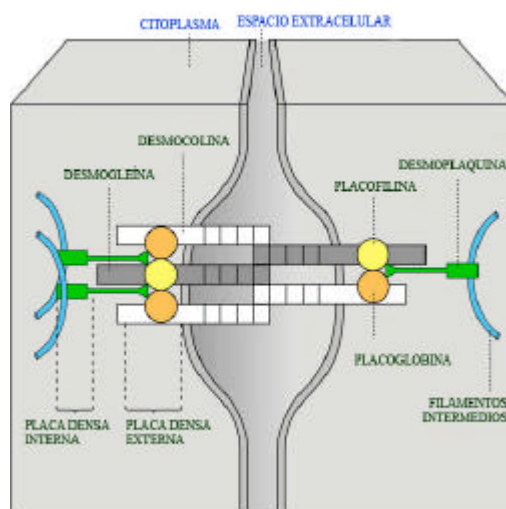


Figura 2: Estructura del desmosoma. Se observa la interrelación de las distintas proteínas constitutivas de los desmosomas.

La distribución de los distintos subtipos de Dsg no es uniforme en todo el espesor de la epidermis. La Dsg1 se expresa de forma creciente según va a madurando el queratinocito, siendo mayor en las capas superiores de la epidermis (capa granulosa). Por el contrario, la

Dsg3 es expresada de forma inversa, siendo mayor en los estratos inferiores (capa basal) (Iwatsuki et al, 1995) (**Figura 3**).

En las mucosas, curiosamente, la Dsg3 se expresa en todo el espesor de la epidermis, aunque es mayor en las capas superiores. La Dsg1 se expresa en mucosas con una distribución similar a la de la piel. (Shirakata et al, 1998; Amagai et al, 1996) (**Figura 3**).

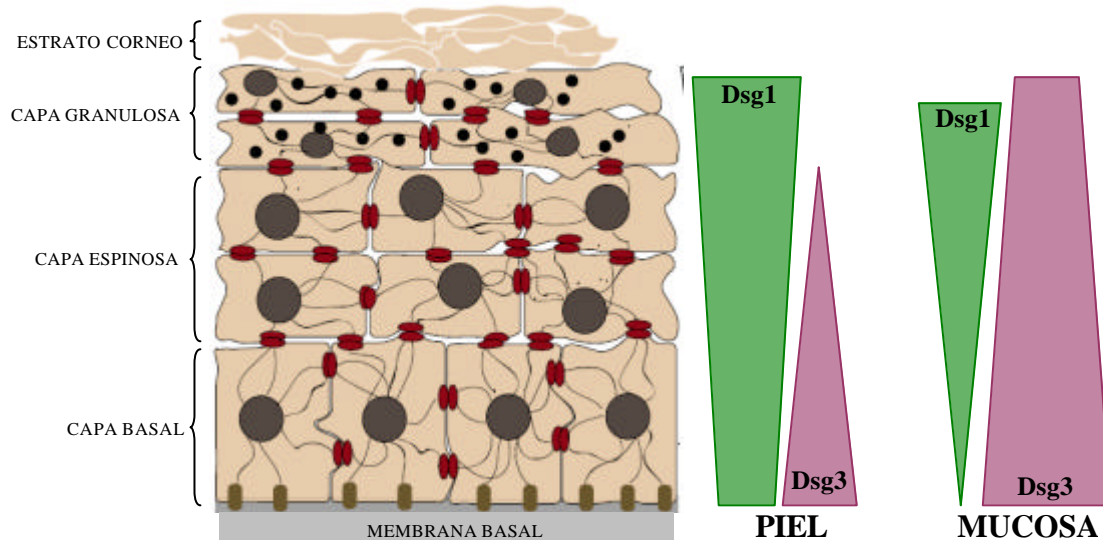


Figura 3: Distribución de las desmogleínas en piel y mucosas. Modificado de Kottke et al.

Existe una variabilidad de expresión de Dsg según la región anatómica, siendo la cantidad de Dsg3 mayor en zonas del cuero cabelludo y mucosa oral, mientras que la Dsg1 se expresa en mayor cantidad en región facial y tronco superior y en muy poca cantidad en mucosa oral (Ioannides et al, 1991).

Otra caderina desmosómica es la desmocolina, que es muy semejante a la Dsg. Existen también tres isoformas. La Dsc1 suele estar en los estratos más superficiales y más maduros de la epidermis, la Dsc2 en estratos intermedios y la 3 a nivel de la capa basal (Legan et al, 1994).

La Dsg y la Dsc se unen íntimamente con la placoglobina (PG) (**Figura 2**). Esta última proteína de la placa desmosómica se expresa en toda la epidermis y su expresión aumenta de forma paralela a la densidad de los desmosomas, siendo mayor en las capas más profundas. La PG se une de forma selectiva a cada caderina, ya que la Dsg y la Dsc se unen a epítomos diferentes de esta proteína en un mismo desmosoma. La Dsg y la Dsc no se unen a la PG en la misma proporción. Mientras que una molécula de Dsg se une a seis de PG, la Dsc se une únicamente a una (Kowalczyk et al, 1996). Se ha observado que ratones *knock out* para la PG presentan desmosomas morfológicamente normales, por lo que se piensa que esta

proteína no es imprescindible para la estabilidad de las uniones intercelulares (Ruiz et al, 1996).

La desmoplaquina (DP) es otra de las proteínas constitutivas de la placa desmosómica que participa en la unión de los filamentos intermedios de queratina al desmosoma (**figura 2**). Se expresa en la totalidad de la epidermis, pero en mayor cantidad en estratos profundos que en estratos superficiales (Arnemann et al, 1993). Existen dos isoformas: la DP I y la DP II. Las DP no son exclusivas de los epitelios. La porción aminoterminal de la desmoplaquina interacciona directamente con la placa desmosómica, probablemente a través de la PG, de forma directa o por proteínas desconocidas.

Por último, existen otras proteínas constituyentes de la placa desmosómica, que unen el desmosoma a los filamentos intermedios como la placofilina (Smith et al, 1998), la desmocalmina de 250 kD, la plectina, una proteína relacionada con la lámina B de 140 kD y la proteína de banda 6 de 5 kD (Kapprell et al, 1988).

1. 2. 3. 1. Antígenos del PV

-Desmogleína 3

Las técnicas de inmunoprecipitación han sido de gran utilidad para la identificación de los antígenos implicados en el PV. Los estudios iniciales de Stanley et al en 1982 y 1984 identificaron dos bandas principales de 130 y 80 kD cuando utilizaron IgG-PV para inmunoprecipitar extractos de queratinocitos humanos en cultivo marcados con aminoácidos radiactivos, y asumieron que eran los antígenos diana del PV (Stanley et al, 1982; Stanley et al, 1984). Posteriormente, Korman et al en 1989, identificaron una banda de 85kD que representaba a la PG y observaron que la IgG-PV no se unía directamente a esta proteína, quedando como único antígeno diana a la proteína de 130 kD (Korman et al, 1989). Amagai et al en 1991, mediante *immunoscreening* con IgG-PV purificada, identificaron la proteína de 130 kD como una nueva desmogleína, llamada Dsg3 (Amagai et al, 1991).

Mediante el uso de proteínas de fusión que representaban distintas porciones de los dominios extracelulares de la Dsg3 fue posible determinar que la principal porción antigénica para el suero de PV estaba en los dominios EC1, EC2 y EC4 (Amagai et al, 1992). Usando anticuerpos de PV purificados se observó que estos se unían a los desmosomas y producían un patrón similar al observado en el PV mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Sin embargo, los anticuerpos inmunoabsorbidos no

mostraban ningún efecto patogénico. Esto podría ser debido a que no tenían una conformación original en las proteínas de fusión bacterianas. A pesar de estos resultados contradictorios, trabajos recientes han demostrado que los anticuerpos dirigidos frente a los dominios EC1 y EC2 se asocian a las fases activas de la enfermedad, por lo que sí parece que estas regiones de la Dsg3 guardan un papel más relevante en la adhesión entre los queratinocitos (Mülller et al, 2008).

Amagai et al en 1994 produjeron una nueva serie de proteínas de fusión con Dsg3, esta vez con una porción de IgG humana expresada mediante un baculovirus en células de insecto Sf9 (Amagai et al, 1994). La adsorción de la porción extracelular de la Dsg3-Ig eliminaba la mayor parte de la actividad patogénica del suero del PV, reseñando la importancia de los anti-Dsg3 en la patogenia del PV (Memar et al, 1996).

Por otra parte, usando ratones *knock out* para la Dsg3 y Dsg3 recombinante como antígeno, se vió que estos ratones desarrollaban anticuerpos anti-Dsg3 pero no presentaban PV, ya que no tenían antígeno diana (Amagai et al, 2000). Para mostrar la patogenicidad de estos anticuerpos, los esplenocitos de los ratones *knockout* para la Dsg3 inmunizados fueron transferidos a ratones Dsg3^{+/+} Rag 2^{-/-} (ratones inmunodeficientes). Los ratones huéspedes, como se esperaba, desarrollaron el fenotipo del PV. Se hizo obvio que los anticuerpos anti-Dsg3 podrían tener como diana distintos epítomos en el dominio N-terminal de la molécula y que algunos de esos anticuerpos anti-Dsg3 no eran patogénicos.

Cuando los esplenocitos de los ratones Rag 2^{-/-} inmunizados con Dsg3-hibridomas fueron usados para producir anti-Dsg3 fue posible aislar los clones específicos que producían anticuerpos patogénicos que reaccionaban con la porción EC1 de la Dsg3 (Tsunoda et al, 2003). Este hecho facilitó los intentos de producir anticuerpos monoclonales humanos de linfocitos periféricos, y se crearon clones productores de anticuerpos anti-Dsg3 patogénicos y no patogénicos. Finalmente, los ratones Dsg3^{-/-} *knock out* desarrollaban ulceraciones en la mucosa que se asemejaban a las lesiones de PV (Allen et al, 1996).

En un estudio de 2008, Takahashi et al, han conseguido desarrollar un nuevo sistema experimental para evaluar la patogenicidad *in vivo* de los clones individuales de linfocitos T Dsg3-reactivos (Takahashi et al, 2008). En este sistema, las líneas de linfocitos T Dsg3-reactivas generadas *in vitro* de ratones Dsg3^{-/-} fueron transferidos a ratones inmunodeficientes Rag-2^{-/-} (Dsg3^{+/+}) para examinar si líneas de linfocitos T tenían la habilidad de inducir el fenotipo del PV después de esta transferencia. Este trabajo ha

confirmado los estudios previos que mostraban que los autoanticuerpos anti-Dsg3 tenían un papel directo en la inducción del PV en humanos.

-Antígenos no desmogleínicos en el PV

En los últimos años, se ha puesto en duda que la Dsg sea el único antígeno implicado en el PV debido a los siguientes hechos: se puede inducir lesiones de PV en ratones *knockout* para la Dsg3; el suero del PV contiene múltiples anticuerpos frente a diferentes moléculas de adhesión diferentes a la Dsg3 y también frente a receptores colinérgicos; la inhibición experimental de la acantólisis inducida por la IgG-PV puede obtenerse mediante la interferencia con diferentes cascadas de señalización intracelular y los agonistas colinérgicos muestran una actividad antiacantolítica *in vitro* e *in vivo*.

Algunos estudios mostraron que cuando a ratones *knockout* para la Dsg3 se les administraba suero de PV desprovisto de anticuerpos anti-Dsg1 desarrollaban ampollas en la piel (Kalish et al, 2001). Además, trabajos recientes han mostrado que los títulos elevados de anticuerpos anti-Dsg podrían ser posteriores a empeoramientos de la enfermedad en vez de ser anteriores a ella y que existen individuos sanos portadores de altas cantidades de anticuerpos anti-Dsg3 en su suero (Torzecka et al, 2003).

En varios trabajos se ha demostrado en pacientes con PV anticuerpos dirigidos frente a distintas dianas antigénicas:

- En el suero de pacientes con PV, existen una serie de anticuerpos dirigidos frente a diferentes antígenos queratinocitarios que van desde un peso molecular de 12 a 190 kD. Además de frente a moléculas de adhesión como Dsg1, 2 y 3, se observan también anticuerpos frente a Dsc (Demochowski et al, 1993), PG (Korman et al, 1989), E-cadherina y el colágeno VII/BP180 (Schumann et al, 2000), así como también una amplia lista de anticuerpos frente a varios receptores celulares, como el FcεRIα, anexinas y receptores de acetilcolina (Grando et al, 2000).

- En un estudio reciente, se encontraron anticuerpos anti-E-cadherina, en el 73% de los pacientes con PV cutáneo-mucoso mientras que ninguno de los pacientes con PV mucoso del estudio presentaban estos anticuerpos (Evangelista et al, 2006).

- Otros trabajos recientes han descrito que el 40% de los pacientes con PV producen anticuerpos anti-tiroperoxidasa, y cuyo significado es todavía desconocido (Pitoia et al, 2005).

- Algunos autores han identificado entre los anticuerpos del PV, anticuerpos frente a la pemfaxina (PX). Se ha sugerido el papel patogénico de los anticuerpos anti-PX en el PV por el hecho de que tras su eliminación por adsorción se inhibe la acantólisis *in vivo* (Nguyen et al, 2000). Sin embargo, cuando se administran sólo, los anti-PX no inducen lesiones ampollas en ratones recién nacidos, lo que sugiere que la PX podría ser uno de los múltiples antígenos que simultáneamente son diana de los anticuerpos y contribuyen en la producción de la acantólisis.

- Asimismo, se han publicado varios estudios que revelan la presencia de autoanticuerpos frente a receptores de acetilcolina en el suero de pacientes con PV (Nguyen et al, 2000). Se sabe que los queratinocitos humanos contienen una elaborada red no-neuronal de acetilcolina (ACh). El sistema colinérgico de la epidermis humana consta de dos clases de receptores colinérgicos, los receptores nicotínicos y muscarínicos de acetilcolina (nAChR y mAChR), los cuales están implicados en la regulación de la adhesión entre células y entre célula-matriz al igual que en la migración celular (Grando et al, 2006).

No está claro si los autoanticuerpos frente a los receptores colinérgicos en el PV contribuyen directamente en la acantólisis. No obstante, se ha demostrado que agonistas colinérgicos pueden disminuir la acantólisis en el PV *in vivo* e *in vitro* (Nguyen et al, 2004) y que la aplicación de agonistas colinérgicos como la pilocarpina tienen efecto terapéutico en las lesiones orales y cutáneas de pacientes con PV (Iraji et al, 2006). Además, los agonistas colinérgicos aumentan los niveles de Dsg1, Dsg3 y E-cadherina y los antagonistas colinérgicos producen una disociación queratinocitaria, que es paralela a la fosforilación de esas moléculas (Grando et al, 2006). Así pues, si bien parece que la ACh puede tener un papel en la acantólisis del PV, no se sabe todavía con certeza cómo podría contribuir en el proceso de disociación celular autoinmune que aparece en esta enfermedad.

Todos estos hallazgos han mostrado conceptos alternativos acerca de la patogenicidad de anticuerpos contra antígenos no-Dsg y han permitido plantear la hipótesis *Multiple Hit* que implica que entre los diferentes antígenos reconocidos por el suero del PV, la Dsg3 sería uno más y que cada uno contribuiría en parte a la pérdida de adhesión y la formación de ampollas. Esta hipótesis está sustentada por el hecho de que casi 200 genes del queratinocito están regulados negativamente y 31 regulados positivamente por la IgG-PV (Nguyen et al, 2004).

1. 2. 3. 2 Inmunidad humoral

En 1982 se demostró por primera vez *in vivo* el papel patogénico de los anticuerpos IgG en el PV. Los autores de este trabajo inyectaron vía intraperitoneal en ratones recién nacidos anticuerpos purificados de pacientes con PV. Estos anticuerpos fueron capaces de reproducir en ratones recién nacidos lesiones cutáneas clínica e histológicamente idénticas a las observadas en pacientes con PV (Anhalt et al, 1982).

Otros hallazgos que ayudaron a confirmar el papel patogénico de estos anticuerpos fueron la observación de la presencia transitoria de lesiones de PV en recién nacidos con madres afectas de PV (Ugajin et al, 2007), la negatividad de la inmunofluorescencia directa (IFD) en la piel de los pacientes cuyo suero había sido tratado mediante inmunoadsorción (Eming et al, 2006) y la mejoría clínica de los pacientes tratados mediante plasmaféresis (Turner et al, 2000).

En el PV pueden objetivarse diferentes subclases de IgG. Los autoanticuerpos en el PV son mayoritariamente IgG₄, aunque en algunos pacientes pueden observarse IgG₁ y excepcionalmente IgG₃ (Brooks et al, 1989; Jones et al, 1988). En pacientes con PV en remisión, controles sanos y familiares sanos de pacientes con PV la subclase predominante es la IgG₁ (Bhol et al, 1995). En la actualidad se piensa que la subclase más patogénica es la IgG₄ (Futei et al, 2000).

Los pacientes con PV con afectación predominante mucosa presentan anticuerpos frente a la Dsg3 y aquellos con afectación cutáneo-mucosa presentan además anticuerpos frente a Dsg1 (Amagai et al, 1999). Un hecho curioso es que los anticuerpos purificados de pacientes con enfermedad predominantemente mucosa no son capaces de producir enfermedad tras su transferencia pasiva a ratones recién nacidos, mientras que los anti-Dsg3 de pacientes con afectación cutáneo-mucosa si lo logran (Amagai et al, 1994). Quizá este hecho se deba a que en los pacientes con la forma mucosa los anticuerpos frente a la Dsg3 reconocen epítopes patógenos que no se reconocen de igual forma en la Dsg de la epidermis de la piel. También se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-Dsg1 de pacientes con lesiones cutáneo-mucosas tiene la capacidad de inducir lesiones en ratones recién nacidos. (Ding et al, 1999).

La respuesta que presentan los pacientes frente a la Dsg1 y 3 no es siempre la misma, sino que puede ir cambiando a lo largo de la enfermedad, quizá facilitado por un fenómeno de *intermolecular epitope spreading*. Este fenómeno postula que en un inicio se produce una

respuesta autoinmune frente a la Dsg3 y en algunos casos también frente a la Dsg1 posteriormente, quizás por semejanza molecular entre ambas, o bien porque tras la reacción inmunológica inicial se expondrían otros antígenos epidérmicos, observándose una respuesta inmunológica adicional frente a la Dsg1. Esto podría explicar porque algunos pacientes presentan lesiones únicamente en mucosa oral (anticuerpos frente a la Dsg3) y posteriormente desarrollan lesiones cutáneas (anticuerpos frente a Dsg1 y Dsg3). Además, se ha observado que algunos pacientes sufren una variación clínica desde un PV a un PF, con un cambio en el perfil de anticuerpos circulantes, pasando de presentar anti-Dsg3 a presentar solamente anti-Dsg1 (Iwatsuki et al, 1991; Kawana et al, 1994). Este hecho, en cambio, se debería al fenómeno de *intramolecular epitope spreading*. Los pacientes que anteriormente presentaban anticuerpos patógenos frente a Dsg3 dejan de presentarlos y desarrollan anticuerpos frente a Dsg1 únicamente. Quizás, estas observaciones ponen de manifiesto la presencia de uno o varios epítopes comunes entre ambas Dgs (Salato et al, 2005).

Algunos autores han observado que los autoanticuerpos IgA e IgE pueden unirse a la porción extracelular de la Dsg3, aunque su significado es incierto (Spaeth et al, 2001). No obstante, todos estos hallazgos expuestos ponen de manifiesto la respuesta autoinmune humoral tan variada que aparece en el PV, frente a varios antígenos, dentro de los cuales aquellos frente a las Dsg tendrían un papel patogénico más relevante. Además, esta respuesta estaría dentro de otra respuesta humoral más general en el paciente, fruto de una disregulación inmunológica, y que se pondría de manifiesto en algunos casos por la asociación de otras enfermedades autoinmunes asociadas, tal y como se ha descrito (Shabbir et al, 1984).

1. 2. 3. 3. Inmunidad celular

Las diferencias halladas entre las subclases de IgG en el PV son el resultado del desequilibrio existente entre linfocitos Th₁ y Th₂. Algunos estudios han hallado un incremento de la actividad Th₁ respecto a Th₂ en el PV (Zillikens et al, 1993), aunque otros autores señalan que existe una respuesta Th₂ de linfocitos que reconocen la Dsg3, la cual sería la causante del desarrollo inicial de la enfermedad (Lin et al, 1997). Los linfocitos Th₂, mediante la secreción de sus citoquinas, estimularían a las células B para producir IgG₄. No obstante, también se ha demostrado que los linfocitos T reaccionan frente a la Dsg3, sintetizando citoquinas propias del Th₁, a excepción de la IL-4 (Kricheli et al, 2000). Estos hallazgos contradictorios pueden explicarse por la presencia de una policlonalidad de

linfocitos CD4+, ya que la Dsg tiene varios segmentos inmunorreactivos, y deberse también al curso cambiante de la enfermedad a lo largo del tiempo, alternando fases de mayor actividad Th₁ o Th₂. Cuando es predominante la respuesta Th₂ se produce un aumento de IgG₄, y si lo es la Th₁ se estimula la producción de IgG₁, IgG₂ e IgG₃. Este hallazgo plantea la hipótesis de que la IgG₄ no sería la única isoforma de IgG patógena en el PV (Kricheli et al, 2000). No obstante, el hecho de la IgG₄ sea la única subclase de IgG que no se une a las fracciones del complemento, y de que este sistema no es estrictamente necesario para producir lesiones de PV en un sistema *in vivo* (Anhalt et al, 1986), plantea al menos la posibilidad de que la IgG₄ puede ser la subclase de IgG con una acción más patógena en el PV.

Asimismo, varios estudios han demostrado la participación de la inmunidad celular en el PV al detectar niveles elevados de ciertas IL. Otros autores han hallado un aumento en los niveles del factor soluble del receptor de la IL-2 (rIL-2s) en el contenido de las ampollas y en el suero de los enfermos y han observado un descenso de dicho receptor tras el tratamiento del PV (Zillikens et al, 1993). Otra posible IL implicada en el PV es la IL-15, cuyos niveles séricos se han correlacionado con la actividad de la enfermedad, número de linfocitos B y células *natural killer* aunque no con el título de anticuerpos. Los niveles de IL-10, relacionada con los niveles del receptor transmembranoso de linfocitos (la molécula CD28), están alterados en el modelo murino de PV según algunos autores (Toto et al, 2000).

Por otra parte, se ha observado que existen dos subpoblaciones de células presentadoras de antígenos distintas en el PV cutáneo-mucoso respecto al predominantemente mucoso. En la primera forma de la enfermedad, los enfermos presentan en sangre periférica un elevado porcentaje de monocitos que expresan altos niveles de células CD14+DR+ (posibles células dendríticas derivadas del monocito), así como de linfocitos B estimulados y un porcentaje bajo de linfocitos naive CD4+ (inductores de la supresión) y de células supresoras CD8+CD11b. En el PV con afectación solamente mucosa, en cambio, se observa un mayor porcentaje de monocitos CD14+DR++ (probables monocitos-macrófagos circulantes). Estos hallazgos podrían explicar las diferencias en la síntesis de anticuerpos entre los dos subtipos de PV, quizá como consecuencia de un procesamiento diferente de un mismo antígeno (Dsg3) (Gonzalez et al, 2000).

Estudios recientes han demostrado las células NK CD56+CD3- están incrementadas en los pacientes con PV activo. Además, cuando se cultivan las células T CD4+ de lesiones

cutáneas de pacientes con PV activo con células NK CD56+CD3- se secretaron altos niveles de IL-6 e IL-8 (Stern et al, 2008).

Todos estos estudios ponen de manifiesto un papel relevante de la inmunidad celular en el desarrollo de las diferentes poblaciones de autoanticuerpos en el PV. Esta producción de autoanticuerpos tendría un mecanismo potenciador de las poblaciones linfocitarias, facilitado por la producción de citoquinas que se secretarían desde las células a los tejidos, y que autoperpetuarían la presentación antigénica, la estimulación linfocitaria y finalmente la producción de los autoanticuerpos.

1. 2. 3. 4. Mecanismos potenciadores de la enfermedad

Aunque los autoanticuerpos IgG tienen un papel fundamental y necesario para producir la acantólisis en el PV, existen mecanismos potenciadores de este proceso que contribuyen a que la inflamación se incremente en las lesiones cutáneas y mucosas.

-Papel del complemento

Es un hecho indiscutible que mediante la IFD en las lesiones de PV se detectan inmunodepósitos de complemento alrededor de los queratinocitos en las capas más profundas donde aparece la acantólisis (el complejo de ataque del complemento (C5-9) y la fracción C3) (Lapierre et al, 1998). Varios estudios empleando veneno de cobra (Anhalt et al, 1986), fracciones Fab₂ y Fab' (Mascaro et al, 1997) de IgG de pacientes con PV o ratones deficientes en C5, han puesto de manifiesto que si bien el complemento puede activarse en lesiones de PV, principalmente por la acción de IgG₁, IgG₂ o IgG₃, su acción se considera más como potenciadora de la acantólisis y no como un proceso necesario para producir la misma (Mascaro et al, 1997).

-Función del sistema plasminógeno-plasmina

Algunos trabajos han mostrado que el activador del plasminógeno (PA) está implicado en la acantólisis del PV. De hecho, el uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) y su receptor (uPAR) se detectan mediante inmunohistoquímica en las lesiones de pacientes con PV pero no en la piel de pacientes sanos (Schaefer et al, 1996). En cultivos de queratinocitos humanos ha podido observarse la activación del sistema uPA/plasmina, así como del receptor uPAR, tras la administración de la IgG-PV (Seishima et al, 1997). Además, el uPAR puede incrementarse por la activación de la proteín-quinasa C (PKC) en cultivos queratinocitarios tras la administración de IgG-PV y se ha postulado que este sistema proteolítico podría tener un papel regulatorio mediante esta quinasa (Kitajima et al, 1999).

Sin embargo, un estudio en el que se empleaban ratones *knockout* para el PA fue determinante para aclarar que aunque el sistema plasminógeno-plasmina podría participar en el proceso de acantólisis, no es imprescindible para que se desarrolle la enfermedad (Mahoney et al, 1999). Este sistema podría ser un proceso como consecuencia del daño epidérmico o simplemente un mecanismo amplificador de la respuesta inflamatoria.

1. 2. 3. 5. Mecanismos moleculares

-EGFR

El *epidermal growth factor receptor* (EGFR) es un miembro de la familia de receptores de membrana HER y es un importante mediador de la diferenciación, supervivencia, migración, adhesión y crecimiento celular. La familia de receptores de tirosina-quinasa (TK) HER consiste en 4 miembros: EGFR (también llamado HER-1, ErbB-1), HER-2 (neu, ErbB-2), HER-3 (erbB-3) y HER-4 (erbB-4) (Klapper et al, 2000). El EGFR es una glicoproteína transmembrana de 170-kDa. Estructuralmente contiene un dominio extracelular que reconoce y se une a un ligando específico, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio intracelular que contiene una tirosin quinasa (TK) con actividad enzimática (**Figura 4**). El HER3, sin embargo, es diferente de los otros miembros de la familia HER ya que carece de dominio TK, aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia de receptores (**Figura 5**).

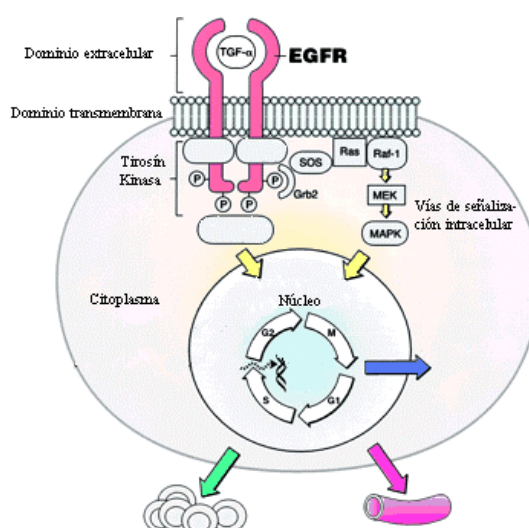


Figura 4: Esquema de los receptores de la familia HER. Su activación pondría en marcha vías de señalización intracelular y la estimulación de la maquinaria del ciclo celular (modificado de Harari et al, 2000).

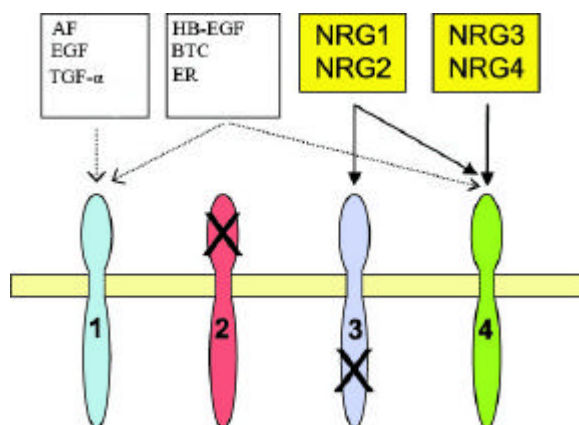


Figura 5: Imagen de los distintos ligandos y dímeros de receptor de HER a los que se unen (Holbro et al, 2004).

Al contrario que otros receptores HER, no se ha identificado hasta la fecha ningún ligando para HER2 (**Figura 5**). Sin embargo, el HER2 es el co-receptor preferido de HER1, HER3 y HER4 (Klapper et al, 1999, 2000).

Los receptores HER se activan mediante dimerización entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes receptores de la misma familia (heterodimerización) (Lemmon et al, 1994). Después de la dimerización del receptor, se produce una activación de la actividad intrínseca de la proteína tirosin-quinasa con la autofosforilación de residuos tirosina intracitoplasmáticos. Estos eventos provocan el reclutamiento y la fosforilación de varios substratos intracelulares conduciendo señales mitogénicas y otras vías de señalización intracelular (Riese and Stern, 1998).

La vía *Raf-Raf mitogen-activated protein kinase* (Alroy and Yarden, 1997), la vía fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) (Muthuswamy et al, 1999) y la fosfolipasa C (PLC)-PKC (Marmor et al, 2004) son las principales rutas de señalización para la familia HER, incluyendo el EGFR (**Figura 6**).

Múltiples vías de señalización adicionales son inducidas a través del EGFR. La activación de los receptores HER puede implicar la activación de otros transductores de señales o activadores de proteínas de transcripción como la STAT (Yu et al, 2004), la Src (cuya actividad tirosin-quinasa se ha demostrado que aumenta en respuesta a la señalización del EGFR (Ishizawa et al, 2004)) o la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Bjornsti et al, 2004), entre otras. Estas vías regulan múltiples procesos biológicos, como la expresión génica, proliferación celular, angiogenesis, inhibición de la apoptosis y adhesión celular.

Existen múltiples ligandos de receptores HER que provocan la formación de complejos homo- o heterodiméricos entre los 4 receptores HER (Olayioye et al, 2000). Dentro de la familia de ligandos de los receptores HER se distinguen tres grupos funcionales en cuanto a sus capacidades para unir y activar a uno u otro receptor. En el primer grupo estarían incluidos el *epidermal growth factor* (EGF), el *transforming growth factor* (TGF- α) y la anfirregulina (AR), los cuales son capaces de unir y activar a homodímeros del EGFR y a heterodímeros de este con otros receptores de esta familia (Klapper et al, 2000) (**Tabla 2**). En el segundo grupo incluiríamos a las neuroregulinas (NRG), las cuales se unen a homodímeros de HER3 o de HER4 y a heterodímeros de estos con otros receptores de la familia (Tzahar et al, 1994) (**Tabla 2**). En el tercer grupo estarían la betacelulina (BTC), la epirregulina (EPR) y el *heparin binding epidermal growth factor-like* (HB-EGF), que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de HER4 (Jones et al, 1999), como a heterodímeros de cada uno de ellos con otros miembros de la familia (**Tabla 2**). El HER2 es, como hemos descrito anteriormente, un receptor huérfano que carece de ligando directo conocido, aunque es activado por EGF, TGF- α , BTC o NRGs cuando se heterodimeriza con el EGFR o HER4.

LIGANDOS	DÍMEROS DE HER
EGF TGF- α AR	HER1-HER1 HER1-HER2
BTC HB-EGF EPR	HER1-HER1 HER1-HER2 HER2-HER4 HER4-HER4
NRG-1 NRG-2	HER3-HER3 HER2-HER3 HER2-HER4 HER4-HER4
NRG-3 NRG-4	HER2-HER4 HER4-HER4

Tabla 2: Ligandos de la familia HER y dímeros de receptor de HER a los que se unen.

Por todo ello, las posibles combinaciones entre los miembros de la familia de receptores HER son muy numerosas, y cada receptor homo- y heterodimérico puede activar diferentes vías de señalización intracelular que provocan respuestas celulares específicas, resultando en una enorme diversidad de señalización (**Figura 6**).

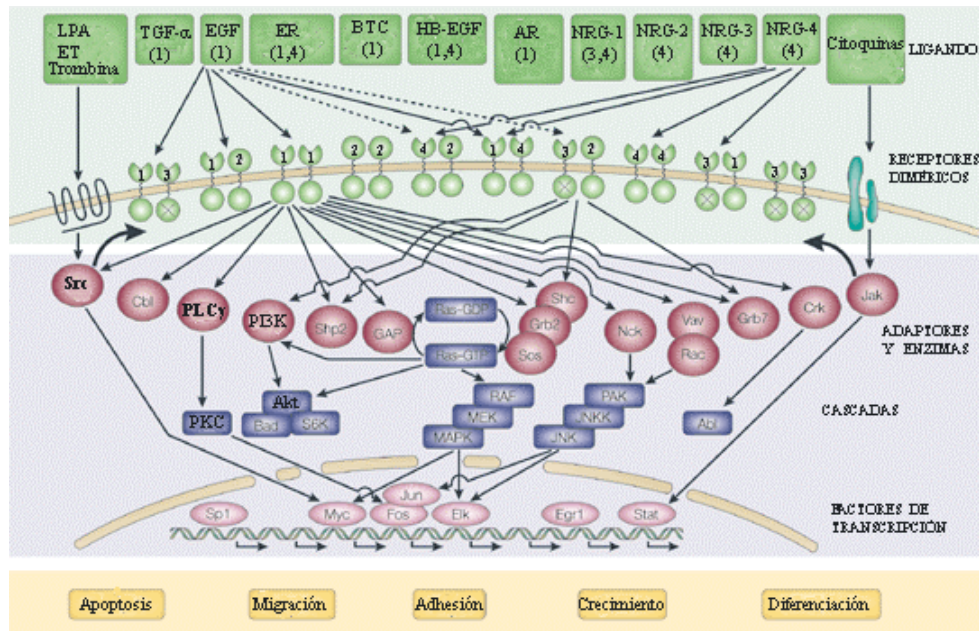


Figura 6: Esquema de las distintas vías puestas en marcha por los receptores HER (modificado de Yarden et al, 2001).

Fisiológicamente, el HER1 se expresa principalmente en las células de la capa basal de la epidermis (Green et al, 1983; Holbro et al, 2004). La HER2 se expresa normalmente en las células de la capa basal epidérmica y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Kiguchi et al, 2000). Además, la HER3 parece que se expresa en todas las capas de la epidermis humana y murina, aunque fundamentalmente en la capa suprabasal (de Potter et al, 2001). La HER4 no se expresa normalmente en la epidermis.

Algunos estudios han evidenciado que el EGFR podría tener un papel importante en el ensamblaje y desensamblaje de los desmosomas y las uniones adherentes (Gaudry et al, 2001; Lorch et al, 2004; Yin et al, 2005). En cuanto a la implicación del EGFR en la patogénesis del PV algunos trabajos han demostrado que el EGFR está implicado en la activación de vías de señalización intracelular en la acantólisis de queratinocitos en cultivo (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007).

-Vía del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

Las PI3-Ks (fosfatidil-inositol-3-quinasa) son una familia de enzimas conocidas como importante reguladoras *upstream* de multitud funciones celulares, tales como el crecimiento, proliferación, diferenciación, movilidad, regulación del citoesqueleto, supervivencia y señalización intracelular. Se sabe que esta vía juega un importante papel en la prevención de la apoptosis en varios tipos celulares (Takashima et al, 1996).

La PI3-K es activada por numerosos receptores transmembrana en la membrana plasmática. Estos receptores se activan, normalmente mediante una autofosforilación de tirosina, después de la unión con un ligando (normalmente factores de crecimiento), y reclutan la PI3-K al lado citoplasmático de la membrana plasmática. En ese momento la PI3-K fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato y lo convierte en fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato, el cual activa después a la Akt (Franke et al, 1997) (**Figura 7**).

La Akt (protein-quinasa B), es una serina/treonina-quinasa, que se ha demostrado que se regula mediante señales *upstream*, principalmente como consecuencia de la activación de la PI3K y que desempeña un papel importante en promover la supervivencia celular en los procesos de apoptosis (Brazil et al, 2001). La Akt activada inhibe los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, BAD (Datta et al, 1997), Bax, caspasa 9 (Cardone et al., 1998), entre otros, mediante fosforilación. La Akt regula además el crecimiento celular a través de la activación de la mTOR (Manning et al, 2007).

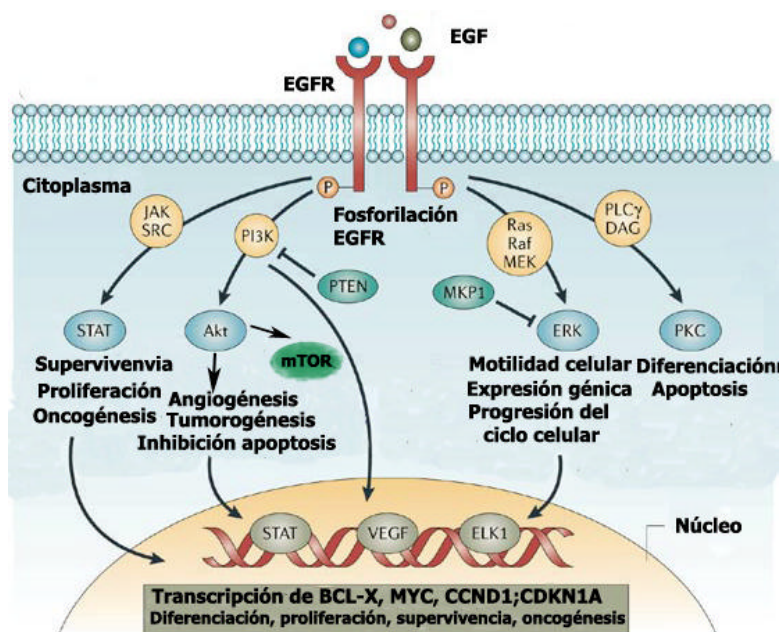


Figura 7: Esquema sobre la vía del EGFR-PI3K-Akt-mTOR. Modificado de Nyati et al, 2006.

La mTOR es una serina treonina-quinasa que tiene un papel fundamental en el control del ciclo celular, regulando la síntesis proteica y la iniciación de la translación (Gingras et al, 2001). La mTOR forma un complejo con la proteína citosólica FKBP-12 y la rapamicina actúa deteniendo el ciclo celular en la fase G₁. Se ha visto que en algunos tipos de cáncer existe una hiperactividad de esta molécula, por lo que los inhibidores de la mTOR se están convirtiendo en una atractiva diana contra el cáncer.

Se ha demostrado que en el PV existe una activación de la vía de señalización del fosfatidilinositol, detectándose una fosforilación de la Dsg3 y de la PG tras la unión de IgG-PV de esta a la Dsg (Aoyama et al, 1999). Además, la administración de la IgG-PV en cultivos celulares causa un rápido incremento transitorio de inositol 1, 4, 5 trifosfato y calcio intracelular dependiente de la PLC que conduce a una activación de la proteín-quinasa C (PKC) y del activador del plasminógeno (Esaki et al, 1995).

Dado que el quelante de Ca²⁺ intracelular libre bloquea la disociación de queratinocitos *in vitro* y que los inhibidores de la calmodulina, PLC y PKC son efectivos en bloquear la acantólisis inducida por la IgG-PV *in vivo*, es posible que esta vía de señalización intracelular esté implicada en la acantólisis del PV, como ha podido demostrar nuestro grupo de trabajo (Sanchez-Carpintero et al, 2004).

Nunca se ha descrito la implicación de la Akt o la mTOR en la patogénesis de la acantólisis del PV.

-Oxido nítrico

El óxido nítrico juega un papel importante en la regulación fisiológica del cuerpo humano, aunque también se piensa que puede estar implicado en enfermedades inflamatorias de la piel (Rowe et al, 1997).

El óxido nítrico se forma por la acción de las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS). Existen varias isoenzimas de la NOS. Dos de ellas se expresan constitutivamente en algunos tejidos: la isoenzima endotelial (eNOS) y la isoenzima neuronal (nNOS). Se ha descrito una tercera isoenzima inducible denominada (iNOS). Todas estas isoformas de NOS están presentes en varios tipos celulares incluidos los queratinocitos (Lyons, 1995).

Un estudio del 2006 demostró en piel de enfermos de PV un aumento de la expresión de la isoenzima iNOS y niveles elevados de los niveles de óxido nítrico en el suero de estos pacientes (Siebra et al, 2006). Otro reciente estudio realizado por nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en el modelo murino de PV, los queratinocitos acantolíticos de la piel de los

ratones presentan una expresión aumentada de iNOS, eNOS, nNOS y de residuos de nitrotirosina. Además, con la administración de inhibidores de la nNOS e inhibidores no específicos de NOS, se consiguió inhibir la acantólisis inducida por la IgG-PV (Marquina et al, 2008), demostrando que la nNOS podría jugar un importante papel patogénico en esta enfermedad.

-Placoglobina

Como componente de las uniones adherentes y desmosomas, la PG juega un papel importante en varios aspectos de la adhesión celular. La deficiencia de PG produce una acantólisis subcorneal, pérdida de desmosomas, y pérdida del anclaje de DP y Dsg del citoesqueleto *in vivo* o *in vitro*. Esto apoya la teoría que la PG es importante en el anclaje del citoesqueleto y es crucial en el ensamblaje de los desmosomas (Bierkamp et al, 1999).

Sin embargo, al menos en parte, las funciones de la PG parecen estar compensadas por otras proteínas de la placa desmosómica como la placofilina I, ya que los queratinocitos deficitarios en PG mantienen el anclaje de Dsg3 en el citoesqueleto y la agregación de queratinocitos es similar a la de líneas celulares normales (Candelari et al, 2001).

Algunos trabajos han mostrado que la unión de IgG-PV a la Dsg3 causa la disociación de la Dsg3 de la PG (Aoyama et al, 1999) y su acumulación en el citoplasma con la sucesiva deslocalización del núcleo (Candelari et al, 2001), sugiriendo un papel directo de esta proteína en la patogénesis del PV.

Existen numerosas evidencias experimentales que muestran que la PG podría tener un papel en la acantólisis. En condiciones normales, la PG está implicada en la transducción de señales al núcleo (Klymkowsky et al, 1999), y su localización está alterada en el PV (Minogna et al, 2001). Además, los queratinocitos de ratones *knockout* para la PG son resistentes a la disociación queratinocitaria producida por la IgG-PV y no muestran una retracción de citoqueratinas y ni rotura de la placa desmosómica (Candelari et al, 2001). Estos hallazgos implican que la PG podría tener un papel relevante en la cascada de señalización intracelular de las caderinas desmosómicas. A estas funciones, habría que añadir el papel inductor de la PG en la expresión de uPAR (Lo Muzio et al, 2002) relacionándola con el sistema plasminógeno-plasmina de los queratinocitos y favoreciendo su actividad proteolítica.

Recientemente se ha publicado que los cambios estructurales sufridos en los desmosomas tras la unión del anticuerpo a la Dsg3 dependen de la PG (De Bruin et al, 2007). Algunos

autores han afirmado también que que la PG es un represor transcripcional del protooncogen *c-Myc* (Williamson et al, 2006) y que los niveles de este último se hayan aumentados en toda la epidermis en el PV (Williamson et al, 2007).

-Src

La Src es una proteína tirosín-quinasa no dependiente de receptor que juega un papel fundamental en la señalización celular. La Src está implicada en el control de múltiples funciones, incluyendo la adhesión, crecimiento, movimiento y diferenciación celular (Frame et al, 2002). Esta TK es una molécula de señalización *downstream* de numerosos receptores de factores de crecimiento incluido el EGFR (Thomas et al, 1997) y conduce señales al núcleo, citoesqueleto u otros componentes celulares. Además, se ha visto que la estimulación de la Src causa la transactivación de del EGFR (Haas et al, 2002).

En múltiples neoplasias, incluyendo el cáncer piel (Serrels et al, 2008), se ha observado un incremento de actividad de la Src. Más recientemente, algunos trabajos han mostrado la implicación de la Src en patologías que cursan con inflamación (Paul et al, 2001; Baruzzi et al, 2008). Con su importancia en la inflamación y su implicación en el cáncer, la Src, al igual que otras proteína-quinasa, se ha convertido en una importante diana terapéutica en la batalla contra el cáncer y en los procesos relacionados con la inflamación (Benati et al, 2008).

En cuanto a la implicación de la Src en el PV, se ha visto que su activación por la IgG-PV a los 30 minutos de su administración en cultivos celulares parece que contribuye a la activación del EGFR y la p38MAPK, ya que la inhibición de la Src reduce la fosforilación del EGFR y la p38MAPK en un 45 y 30% respectivamente (Chernyavsky et al, 2007). Dado que la inhibición de la Src reduce la pérdida de cohesión de los queratinocitos, la retracción de citoqueratinas y la apoptosis inducida por la IgG-PV *in vivo* y la inhibición de tirosin-quinasa bloquea la acantólisis *in vivo*, se podría afirmar que la Src juega un papel significativo en la acantólisis de PV (Chernyavsky et al, 2007). Además, estudios recientes han mostrado que la Src fosforila directamente la p120 catenina en respuesta a la IgG-PV, que se correlaciona con el grado de acantólisis. La p120 catenina está implicada en la estabilización de las caderinas clásicas como la E-caderina en la superficie celular así como en RhoA (Alema and Salvatore, 2007). Por lo tanto, La fosforilación de la p120 catenina mediada por Src podría jugar un papel relevante en la patogénesis del PV.

1. 2. 3. 6. Apoptosis

La apoptosis, es un modo de muerte celular programado, que se utiliza para la eliminación de células superfluas, ancianas, dañadas o infectadas del organismo y es esencial para el normal desarrollo y mantenimiento de la homeostasis celular. Los trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías, están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y neoplásicas.

Las caspasas, también llamadas cisteína aspartato-proteasas específicas, son una familia de proteínas intracelulares implicadas en la iniciación y ejecución de la apoptosis. Las caspasas se expresan normalmente como precursores inactivos (zimógenos) que se activan durante la apoptosis (Nicholson et al, 1997). Estas proteasas se clasifican en dos subgrupos funcionales dependiendo de su papel en el proceso de apoptosis: las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9, y -10) y las caspasas efectoras (caspasa-3, -6, y -7). Las caspasas iniciadoras son capaces de activar las caspasas efectoras o de amplificar la cascada de caspasas mediante el aumento de la activación de las caspasas iniciadoras (Thornberry et al, 1998). Posteriormente, las caspasas efectoras rompen los substratos intracelulares, provocando la muerte celular (Cohen et al, 1997). Las caspasas juegan un papel importante en la respuesta inmune que culminan en la producción de citoquinas más que en apoptosis (Creagh et al, 2003).

Hasta la fecha, se han identificado 3 rutas principales que activan la apoptosis asociada a la activación de caspasas en mamíferos (Creagh et al, 2003) (**Figura 8**). Las tres vías identificadas son la vía extrínseca, la vía intrínseca y la vía dependiente de Granzima-B. Independientemente de la vía de activación de las caspasas, todas las vías conducen a la activación de las principales caspasas efectoras, la caspasa 3, 6 y 7 (**Figura 8**).

Se piensa que la apoptosis juega un papel importante en la muerte de queratinocitos en el PV. La presencia de marcadores de apoptosis ha sido constatada en lesiones precoces de PV previas a la acantólisis (Gniadecki et al, 1998). Se ha observado que la IgG-PV de los pacientes con PV induce marcadores moleculares de apoptosis en queratinocitos en monocapas y cultivos celulares (Milner et al, 1999; Pelacho et al, 2004). La apoptosis se ha detectado en las lesiones cutáneas y en la piel perilesional de pacientes con PV y PF (Gniadecki et al, 1998) y marcadores de apoptosis como la fragmentación de DNA, aumento de la expresión de moléculas proapoptóticas como Fas, FasL, Bax, p53 y disminución de marcadores anti-apoptóticos como Bcl-2 y FLIP, al igual que la activación de las caspasas 1, 3 y 8 han sido observados después del tratamiento con IgG-PV de queratinocitos en cultivo (Arredondo et al, 2005). Además, los inhibidores de caspasa y

calpaína pueden bloquear la acantólisis producida por IgG-PV en las monocapas de queratinocitos (Arredondo et al, 2005).

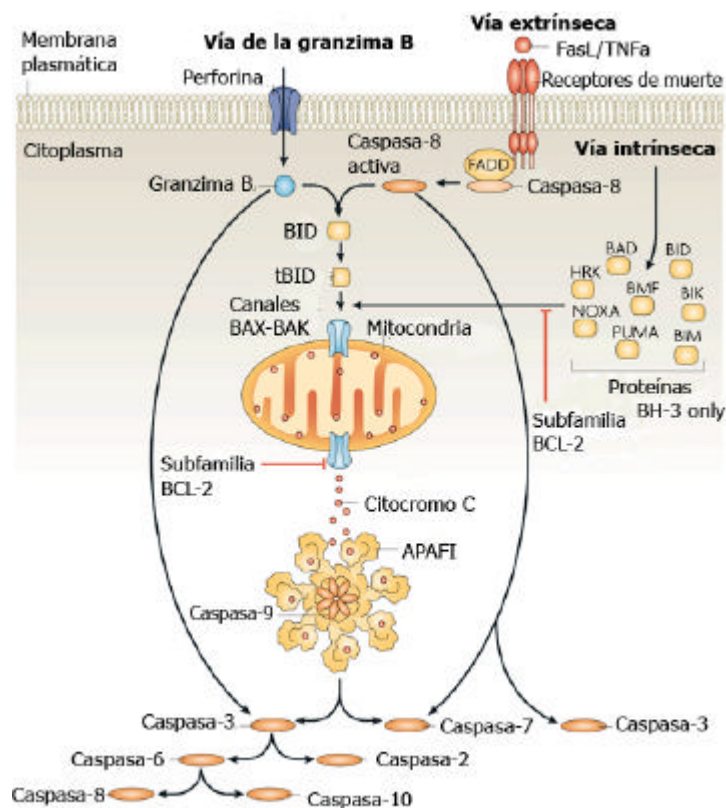


Figura 8: Esquema de las vías de activación de las caspasa. Modificado de Taylor et al, 2008.

1. 2. 4. Teorías sobre la etiopatogenia del PV

Aunque se han implicado diferentes procesos en la etiopatogenia del PV, entre los que destacan la producción de autoanticuerpos (IgG-PV) que se unen a un antígeno (Dsg3, receptores de ACh,...); una serie de mecanismos potenciadores de la respuesta inflamatoria (proteasas, sistemas de complemento,...) que potencian la acantólisis, y la participación de varias vías de señalización intracelular (EGFR, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, FasL,...) que intervienen de forma activa en la inducción de la acantólisis, el mecanismo último por el cual se rompen las uniones intercelulares es desconocido en esta enfermedad.

Para aclarar la etiopatogenia en el PV se han postulado varias teorías que se desarrollarán a continuación. Cuando se postularon las primeras de estas hipótesis, hay que destacar que sus autores desconocían muchos de los datos de los que disponemos ahora.

1. 2. 4. 1. Teoría compensatoria (*Desmoglein Compensation Theory*)

Esta teoría se fundamenta en la diferente expresión de la Dsg 1 y 3 en la piel y en las mucosas para explicar el nivel de acantolisis en la epidermis en el PV y en el PV. Defiende que la Dsg1 y la Dsg3 son funcionalmente equivalentes en la epidermis y en caso de pérdida de una de ellas la otra podría suplir su función.

En la epidermis de la piel del ser humano y ratón la Dsg3 se localiza principalmente en las capas más profundas, al contrario que la Dsg1, que se encuentra en los estratos epidérmicos más superficiales. Por lo tanto, para que se produzcan ampollas en la piel es necesario que existan anticuerpos anti-Dsg1 y anti-Dsg3. En mucosas, la Dsg3 se expresa en todos los estratos, mientras que la Dsg1 está casi ausente en las capas más profundas. Por lo tanto, en mucosas se producen ampollas cuando hay anti-Dsg3 circulantes (**Figura 9**).

De acuerdo con este modelo, las ampollas en pacientes con PF ocurren a nivel subcórneo porque la Dsg3 presente en estratos profundos compensa la pérdida de Dsg1 producida por los anticuerpos anti-Dsg1. En el PV, las lesiones en la piel ocurren solamente cuando existen anticuerpos anti-Dsg1 y anti-Dsg3 porque la Dsg1 está presente en todas las capas epidérmicas y compensa la pérdida de Dsg3 cuando solo existen anticuerpos anti-Dsg3 (**Figura 9**).

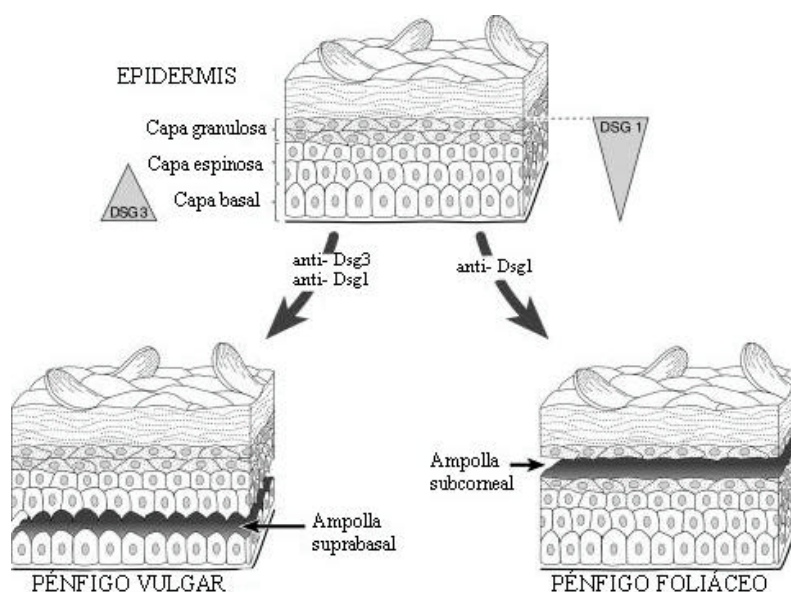


Figura 9: Esquema de la teoría compensatoria de las desmogleínas en el PV y en el PF.

Esta teoría no da respuesta a algunos hallazgos que se observan en el PV. No está claro porque el plano de rotura se restringe a la región suprabasal en el PV cutáneo-mucoso (con anticuerpos anti-Dsg1 y anti-Dsg3) y los anticuerpos anti-Dsg1 no causan separación en la

capa granulosa, ya que en el PF los anticuerpos anti-Dsg1 causan ampollas en estratos más superficiales. Además existen casos de PV en los que el perfil de anticuerpos no se correlaciona con el fenotipo clínico del paciente. Asimismo, los ratones *knockout* para la Dsg3 no presentan lesiones ampollosas espontáneas (Koch et al, 1997).

Otro punto sin resolver de la teoría compensatoria sería el de porque algunas personas que tienen anti-Dsg1 y/o anti-Dsg3 no desarrollan PV. Entre un 40% y un 71 % de los familiares de primer grado de los pacientes con PV presentan títulos bajos de anticuerpos, la mayoría de ellos sin manifestaciones clínicas (Kricheli et al, 2000). Algunas explicaciones para este fenómeno podrían ser que los títulos de anticuerpos son demasiado bajos para inducir la enfermedad; que estos anticuerpos reconocen epítomos funcionalmente no patógenos; o que presenten una subclase de IgG menos patogénica (Spaeth et al, 2001). Además se ha visto que pacientes con otras patologías como silicosis (Ueki et al, 2001) o periodontitis (Grando et al, 2001) sin manifestaciones de enfermedad ampollosa presentan anticuerpos anti-Dsg.

Por último, la inactivación del gen de la Dsg3 o la deplección de la Dsg3 de los queratinocitos de la epidermis de animales de experimentación o de cultivos monocapa no inducen ampollas cutáneas o rotura de los desmosomas, respectivamente.

Así pues, hoy por hoy la teoría compensatoria no puede explicar todos los hallazgos clínicos, histológicos, inmunológicos y moleculares que pueden encontrarse en el PV.

1. 2. 4. 2. Teoría proteolítica

Esta teoría postula que los anticuerpos del PV inducen señales de transducción aberrantes que provocan la fosforilación de la Dsg3 y su disociación de la PG. Esto provocaría que se formase un desmosoma con una configuración inadecuada y la inducción de la transcripción del uPAR mediado por la PG. Al mismo tiempo, la IgG-PV activaría a la PKC que a su vez estimularía la secreción de uPA y la expresión de uPAR en la superficie de la célula, provocando la activación de la plasmina. La plasmina provocaría finalmente la disociación extracelular de los desmosomas preexistentes.

Esta teoría no puede ser sostenida en la actualidad, ya que se ha probado que en ratones *knockout* para uPA y tPA se produce acantólisis tras la inyección de anticuerpos de PV (Mahoney et al, 1999).

1. 2. 4. 3. Teoría de la disrupción física (*Steric Hindrance Theory*) (Shimizu et al, 2004)

Defiende que la unión del anticuerpo del PV a la región N-terminal de la Dsg3 causaría un impedimento estérico de esta caderina imposibilitando la adhesión intercelular mediante la

interferencia directa con las interacciones homo y heterotípicas de las Dsg de los desmosomas. La unión del anticuerpo del PV a la región N-terminal de la Dsg3 produciría una alteración morfológica del desmosoma que le impediría mantener su función de adhesión intercelular. Esta teoría ha sido apoyada en cierta medida por la teoría compensatoria de las Dsg, pero nunca ha sido demostrada mediante evidencias directas.

El hallazgo de la integridad de los desmosomas hasta fases finales de la acantólisis (Bystryn et al, 2006), junto con el hecho de que queratinocitos modificados que no contienen PG (con la función de las Dsg y Dsc conservadas) no producen acantólisis tras el estímulo con IgG-PV (Candelari et al, 2001) y que la inhibición de algunas vías de señalización intracelular inhiben la acantólisis (Sanchez-Carpintero et al, 2004) han contradicho esta teoría.

Además, esta teoría fue también cuestionada cuando se demostró que la IgG-PF causaba la disociación de queratinocitos sin bloquear trans-interacción homofílica de la Dsg1 (Waschke et al, 2005).

1. 2. 4. 3. La hipótesis “encogimiento de las células basales” (Brystyn et al, 2006)

Los autores de esta teoría postulan que la acantólisis sería el resultado de la retracción del citoesqueleto que provocaría un encogimiento celular. Los queratinocitos se separarían porque se encogerían más de lo que los desmosomas podrían soportar y no por un defecto primario en la función de los desmosomas. Este encogimiento estaría limitado a las células basales en el PV porque estas se encogerían más que las células suprabasales tras el contacto con los anticuerpos. Esto podría ser debido a que las células basales son menos rígidas y se encogen más fácilmente cuando la estructura de su citoesqueleto está alterada o bien porque en las células basales se desencadenarían distintas señales intracelulares que conducirían a una reestructuración del citoesqueleto.

Los autores comentan que si la acantólisis fuese debida a alteraciones en las propiedades adhesivas de las Dsgs con la consecuente pérdida de la función del desmosoma, esta debería ocurrir primero en los desmosomas. Sin embargo, se ha comprobado mediante estudios de microscopía electrónica que la acantólisis empieza en las áreas interdesmosomales donde no hay desmosomas. Los desmosomas sólo se separan en las fases más tardías de la acantólisis (Wilgram et al, 1961; Diercks et al, 2009).

Los primeros eventos que se producen tras la unión del anticuerpo del PV a los queratinocitos son los cambios en el citoesqueleto con la retracción de los tonofilamentos (Kitajima et al, 1986) que provoca la rotura de los puentes entre los tonofilamentos y los

desmosomas y que culmina en el encogimiento de las células basales (Hu et al, 1978). La rotura de los tonofilamentos ocurre antes de que los desmosomas muestren alguna alteración visible o pérdida de adhesión (Diercks et al, 2009).

Además, otro hecho que apoyaría esta teoría sería que las células basales presentan distintos receptores celulares respecto a las suprabasales. En concreto, las células basales expresan el subtipo de receptor muscarínico M3 mientras que las suprabasales expresan el subtipo M4. Esto podría favorecer que en las células basales se desencadenen distintas vías de señalización intracelular respecto a en las células suprabasales (Ndoye et al, 1998). Además, en las células basales existen distintos tipos de queratinas que en las suprabasales. Las células basales expresan queratinas 5 y 14, mientras que las suprabasales expresan la 1 y la 10 (Steiner et al, 1991). Ya que las queratinas están implicadas en el mantenimiento de la forma celular, el impacto de la unión de los anticuerpos del PV en la estructura y/o rigidez del citoesqueleto podría ser distinto en ambas células y podría explicar porque el encogimiento celular se limita a las células basales.

1. 2. 4. 3. Teoría de las múltiples vías patogénicas de señalización (*Multiple Hit Theory*) (Grando et al, 2000)

Defiende el hecho de que el suero de los pacientes con PV reconoce distintos antígenos y que la Dsg3 sería sólo uno de ellos. Cada antígeno contribuiría de forma coordinada a la acantólisis por una única vía de señalización intracelular, que se complementarían y actuarían sinérgicamente con las demás a la pérdida de adhesión y formación de ampollas.

1. 2. 5. Manifestaciones clínicas

El PV se caracteriza por la aparición de ampollas flácidas en la mucosa oral, casi siempre inicialmente en orofaringe, y que posteriormente se extienden a otras localizaciones de la cavidad oral, como encías, úvula, lengua, labios y pilares amigdalinos (**Figuras 10A-D**). Estas lesiones suelen ser dolorosas y no suelen curar espontáneamente. Se piensa que la cavidad oral está afectada hasta en el 94% de los casos. El dolor que producen estas lesiones puede ser muy intenso e interferir con la alimentación del paciente, facilitando su malnutrición.

Los pacientes con afectación de mucosa orofaríngea pueden presentar también afectación esofágica y por extensión al tubo digestivo. La afectación esofágica en el PV, suele ser muy frecuente y se ha descrito hasta en el 87,5% de los pacientes. Las lesiones se suelen localizar en la zona distal y medial del esófago. Los pacientes presentan sintomatología caracterizada

por disfagia, odinofagia, hematemesis y en ocasiones vómitos que incluyen restos de mucosa esofágica (esofagitis disecante superficial) (Kageshita et al, 1982).

En una publicación realizada en nuestro centro se realizó un estudio de 16 pacientes con PV (6 casos de PV predominantemente mucoso y 10 casos de PV cutáneo-mucoso). El 94% de los pacientes presentaba síntomas y lesiones clínicas en mucosa oral (España et al, 2007). En todos los casos los síntomas aparecían o empeoraban coincidiendo con los brotes de la enfermedad y mejoraban tras el aumento del tratamiento. A todos los pacientes se les realizó una fibroendoscopia y se observó que en varios de ellos existía afectación nasal y laríngea sin sintomatología clínica. El 62% de los casos presentaban afectación de la mucosa nasal, aunque únicamente tenían síntomas (epistaxis, costras nasales) el 38%. Además, el 75% de los pacientes tenían lesiones activas en la laringe (100% de los casos de PV predominantemente mucoso), de los cuales solo el 44% presentaban síntomas como la disfonía o ronquera. En cuanto a la afectación faríngea, el 62% de los casos presentó afectación de la faringe, todos con síntomas de odinofagia. La afectación del conducto auditivo externo se encontró en 19% de los pacientes y presentaban síntomas como dolor y obstrucción del canal auditivo.

No se sabe exactamente la frecuencia de afectación del PV en otras superficies mucosas, ya que existen muy pocos casos descritos en la literatura. La mucosa rectal y anal se afectan en raros casos y en formas severas de la enfermedad (Malik et al, 2006). Se manifiesta con rectorragias, dolor, mal olor por sobreinfección y adhesión de la ropa interior a las lesiones (**Figura 11A**). Esta afectación puede ser muy limitante e incluso se han publicado casos de muerte por sangrado rectal masivo (Asworth et al, 1987).

La frecuencia de afectación del tracto genital femenino por el PV es desconocida pero distintas publicaciones han descrito que es rara. (Malik et al, 2005). Sin embargo estudios más recientes han mostrado que esta afectación no es tan infrecuente como se había descrito y de una serie con un número considerable de enfermos señalan que hasta el 51% de sus pacientes mujeres tenían afectación genital en algún grado, siendo la segunda afectación más afectada tras la mucosa oral (Akhyani et al, 2008). La afectación del PV en el tracto genital femenino puede comprender el cervix, vagina y la vulva siendo la afectación del cérvix excepcional con muy pocos casos publicados. La clínica que presentan estos pacientes es de dolor o quemazón al orinar, dispareunia, mal olor y adherencia a la ropa interior (Malik et al, 2005).

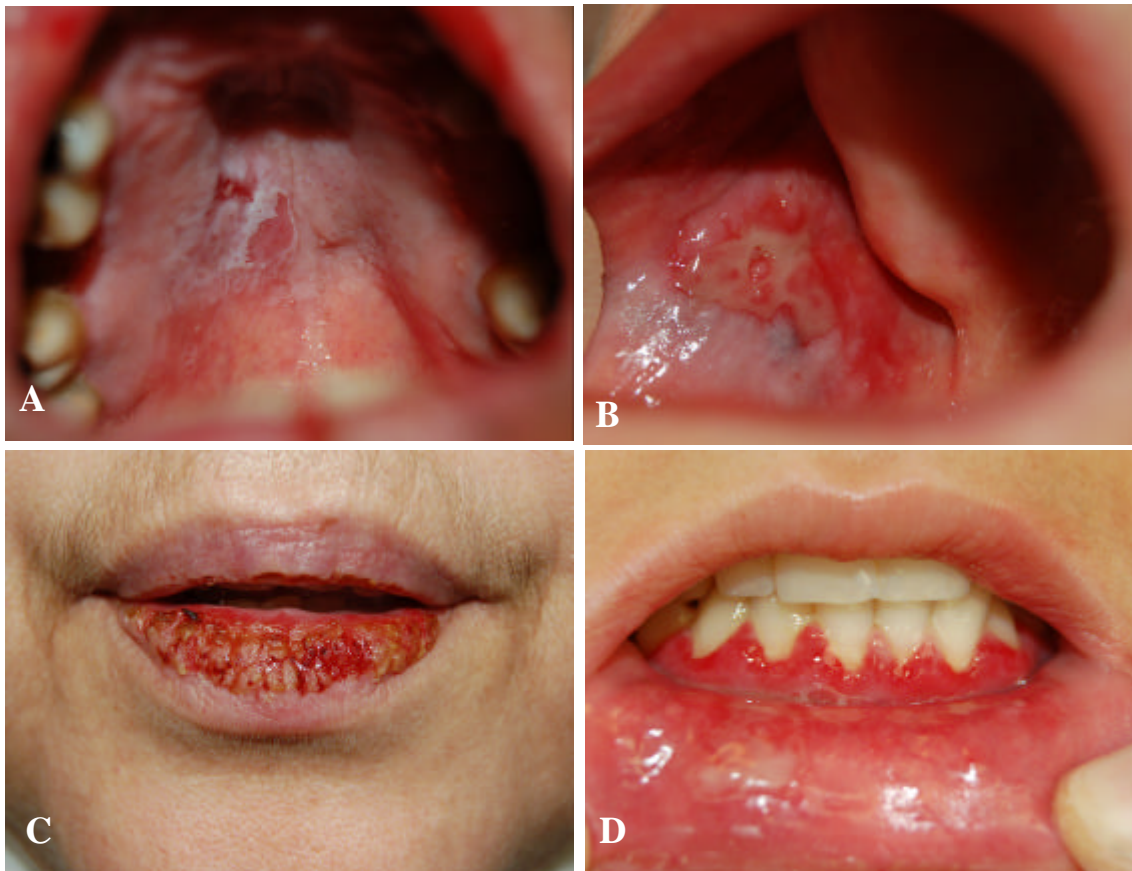


Figura 10: A) Lesiones ulcerosas en el paladar duro de un paciente con PV. B) Lesión ulcerosa de gran tamaño en mucosa yugal. C) Erosiones y costras en bermellón labial de paciente con PV cutáneo-mucoso. D) Erosiones en mucosa gingival de paciente afecto de PV.

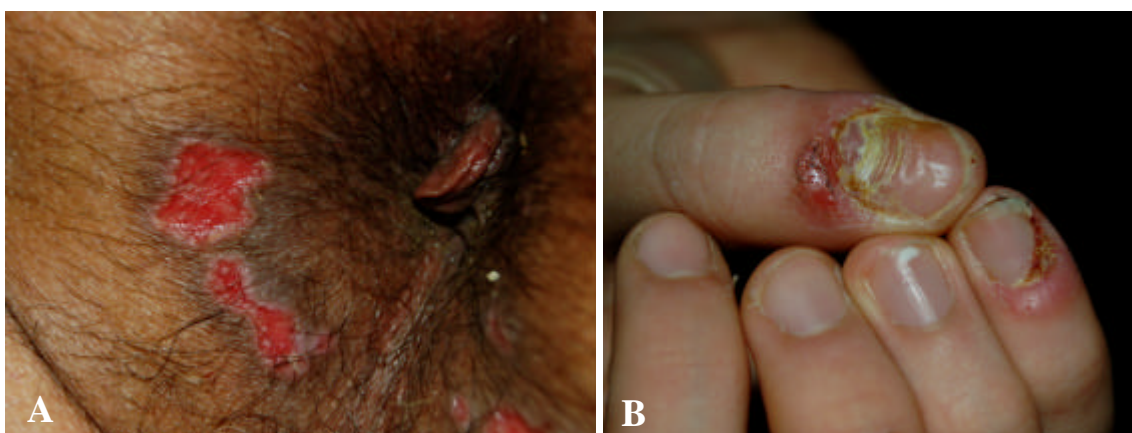


Figura 11: A) Afectación perianal del PV. B) PV que afecta a uñas de manos ocasionando erosiones, paroniquia y onicomadesis.

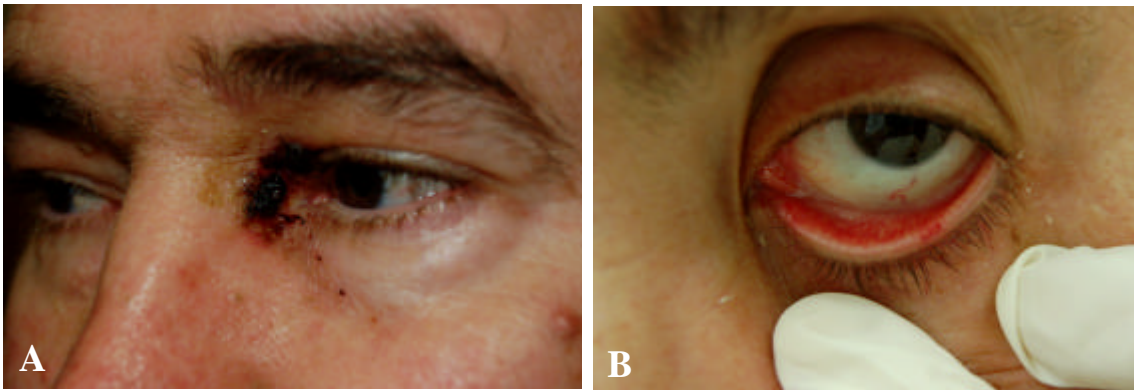


Figura 12: A) Lesiones costrosas hemorrágicas en canto interno de ojo de paciente afecto de PV cutáneo-mucoso. B) Erosión en borde palpebral libre de paciente con PV.

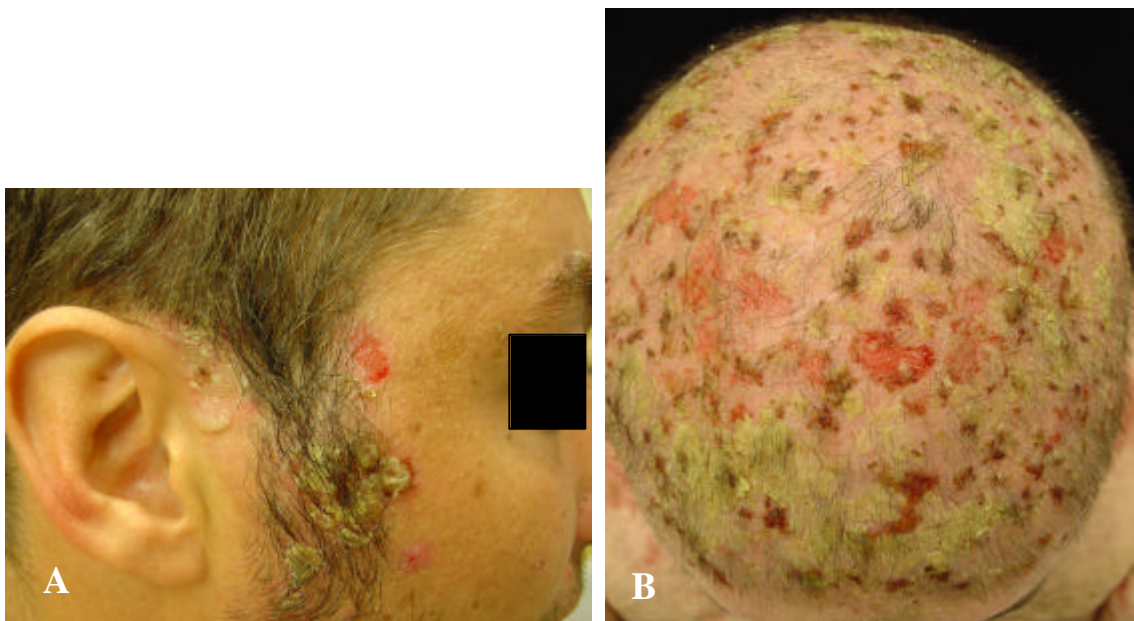


Figura 13: A) Afectación del cuero cabelludo del PV. Se observan lesiones costrosas en región facial y cuero cabelludo. B) Lesiones erosivas y costrosas en cuero cabelludo de paciente con PV cutáneo-mucoso que condicionan una alopecia no cicatrizal.



Figura 14: **A)** Afectación en área intertriginosa (axila) del PV. En estas áreas las lesiones tienden a ser vegetantes. **B)** Erosión sobre fondo eritematoso en espalda de paciente afecto de PV cutáneo-mucoso. **C)** Lesiones ampollas erosionadas en glúteos de mujer con PV. **D)** Erosiones y costras en región facial de varón con PV cutáneo-mucoso.

La afectación del tracto genital masculino es muy infrecuente y suele ocurrir en formas cutaneo-mucosas severas. Las lesiones se suelen localizar en el surco balanoprepucial y la parte proximal del glande (Sami et al, 2001).

Aunque es infrecuente también pueden verse lesiones en región periungueal en forma de paroniquia (**Figura 11B**), onicomadesis y traquioniquia (Carducci et al, 2008).

La afectación ocular del PV es rara, habiéndose publicado unos 20 casos en la literatura. En un estudio reciente de 167 pacientes con PV, solo un 7% presentaron afectación ocular (Daoud et al, 2005). Sin embargo, estudios más recientes señalan que esta frecuencia podría estar infravalorada. Además, comentan a diferencia de estudios anteriores que la afectación ocular no se desarrolla necesariamente en el contexto de formas severas de la enfermedad y no tiene peor pronóstico (Palleschi et al, 2007). Las manifestaciones clínicas más frecuentes suelen ser conjuntivitis y blefaritis, cursando con lagrimeo, irritación ocular, inyección conjuntival, sensación de cuerpo extraño y fotofobia. Solo en una minoría de los casos se observan ampollas o erosiones de la conjuntiva bulbar/palpebral o en el margen palpebral próximo al lacrimal (**Figuras 12A-B**).

Las lesiones cutáneas suelen aparecer meses o incluso años después de las lesiones mucosas, aunque a veces aparecen de forma paralela a las lesiones mucosas, principalmente en la mucosa oral. Es característico el signo de Nikolsky, que se manifiesta como un despegamiento epidérmico al ejercer presión tangencial sobre la piel clínicamente sana de un paciente con PV. Las lesiones cutáneas suelen ser ampollas tensas, menores de 1 cm, que con los días se vuelven flácidas. A veces pueden ser mayores y confluentes afectando grandes superficies de piel. Las localizaciones más frecuentes son el cuero cabelludo, cabeza, cuello y línea media de espalda porque en estos sitios existe una mayor cantidad de desmogleínas (**Figuras 13A-B**). El techo de la ampolla suele romperse con facilidad y normalmente las lesiones se observan en forma de erosiones o costras (**Figuras 14A-D**). Cuando las lesiones curan, normalmente como causa del tratamiento, no suelen dejar cicatrices residuales, salvo una hiperpigmentación post-inflamatoria.

1. 2. 6. Diagnóstico

El diagnóstico del PV requiere la presencia de las lesiones cutáneas y/o mucosas características. Ante un paciente con clínica sospechosa, deberá también realizarse una biopsia cutánea con técnicas de IFD. También deberán investigarse la presencia de anticuerpos circulantes frente a la sustancia intercelular epidérmica (SIE) mediante

inmunofluorescencia indirecta (IFI), y se si dispone de ello buscar si los pacientes presentan anticuerpos circulantes frente a la Dsg1 y 3 mediante técnica de ELISA. Sólo si tenemos alguna duda diagnóstica realizaremos técnicas de *immunoblot* o inmunoprecipitación.

1. 2. 6. 1. Histopatología

La acantólisis suprabasal es el dato más característico en el estudio histopatológico. Se manifiesta como una hendidura o separación entre la capa basal y el resto de la epidermis. La preservación de la capa basal, localizada en el suelo de la ampolla formada, es una condición fundamental para el diagnóstico histológico de PV. No es característica la presencia de un infiltrado inflamatorio, aunque en ocasiones se observa un infiltrado eosinofílico antes de la aparición de la ampolla. Además, en el interior de la hendidura, pueden observarse células redondeadas llamadas “células acantolíticas”, que no son más que los queratinocitos que han perdido su adhesión con el resto (**Figuras 15 A-B**).

1. 2. 6. 2. Inmunofluorescencia indirecta y directa

La IFI detecta los anticuerpos circulantes, conocidos como anticuerpos anti-sustancia intercelular epidérmica (SIE). Los anticuerpos circulantes pueden ser detectados usando como sustratos muestras congeladas de tejidos sanos, incluyendo piel humana, esófago de mono, vejiga de rata o de mono. Se ha visto que el mejor sustrato para la detección de anticuerpos en el PV es el esófago de mono y es el que normalmente se usa en la práctica clínica. En los casos de pacientes con afectación exclusivamente mucosa, la IFI es negativa utilizando piel de ratón, por lo que se debe usar esófago de mono, piel o mucosa humana (Ding et al, 1997).

El título de SIE se emplea para valorar la evolución de los enfermos a lo largo de la enfermedad y su respuesta al tratamiento. El título de estos anticuerpos en el suero de los pacientes se correlaciona con la actividad y extensión de la enfermedad (Bhol et al, 1995). La IFI puede ser una prueba útil para tomar decisiones terapéuticas, ya que pacientes en remisión clínica con IFD positiva tienen mayor riesgo de recaer tras disminuir el tratamiento que aquellos con IFD negativa (Ratnam et al, 1994). No obstante, esta técnica tiene varios inconvenientes. En concreto, no permite determinar frente a que estructuras se unen los anticuerpos y detecta también anticuerpos no patogénicos contra antígenos presentes en el epitelio normal.

La IFI es útil para confirmar el diagnóstico de PV y para diferenciar entre enfermedades ampollas similares. En el PV, al igual que en la mayoría de enfermedades ampollas, los

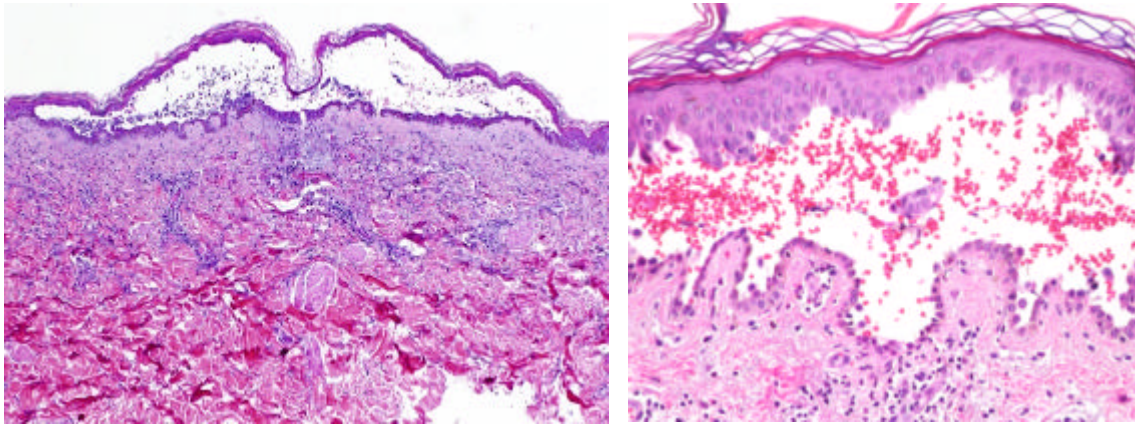


Figura 15: A) Ampolla intraepidérmica, B) con acantólisis suprabasal, y células inflamatorias junto a abundantes hematíes en el interior de la hendidura epidérmica (hematoxilina-eosina).

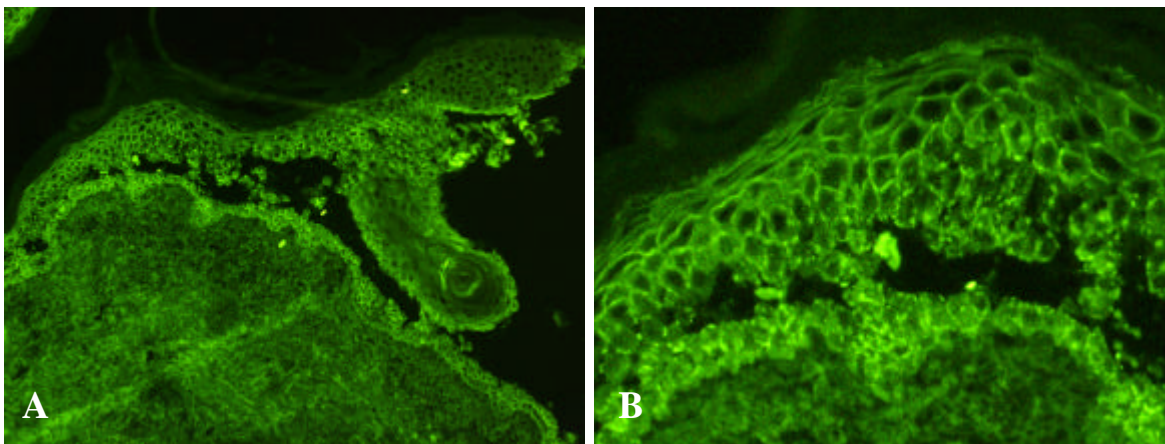


Figura 16: A) Imágenes de IFD del PV. Se observan depósitos pericelulares de IgG en los queratinocitos en los dos tercios inferiores de la epidermis. B) Imagen de detalle.

anticuerpos son de subclase IgG y en los raros casos de pénfigo IgA, son del subtipo IgA. En el caso del PV, el patrón de IFI que se observa es pericelular, con depósito de los anticuerpos en la sustancia intercelular. La intensidad de la fluorescencia suele ser mayor en los dos tercios inferiores de la epidermis, al contrario que en el PF donde los depósitos son fundamentalmente subcorneales, aunque a veces realizar esta distinción no es del todo sencillo.

La IFI es positiva en un 90-100 % de los pacientes con PV en fase activa, teniendo un valor predictivo positivo muy alto. Pueden ocurrir falsos negativos por un error en la técnica, por la baja sensibilidad del substrato y raramente por un fenómeno prozona (Mutasim et al, 2001). Este fenómeno hace alusión a un resultado falsamente negativo en el estudio de IFI en sueros que contienen altos títulos de anticuerpos. En estos casos existe una discordancia entre el número de moléculas de antígeno y anticuerpos, de forma que los receptores se saturan con rapidez, impidiendo el acceso de otros anticuerpos. Para solventar este problema, los sueros de los pacientes pueden diluirse y realizar entonces la prueba de IFI.

Algunos estudios han señalado que la IFI es un test más específico y sensible que el *immunoblotting* para la detección de anticuerpos circulantes en pacientes con PV (Jiao et al, 1997), aunque quizá se requieren más estudios para dar más solidez a esta afirmación.

La IFD detecta en cambio los depósitos de IgG y C3 alrededor de los queratinocitos en las lesiones cutáneas de PV. Para la IFD es necesario tomar una biopsia de piel perilesional (a más de 1 cm de la ampolla) o de la piel sana. Esta muestra debe ser congelada inmediatamente y guardada a -70 °C. Cuando se observan las muestras de IFD al microscopio se detectan depósitos de inmunorreagentes en el espacio intercelular de los queratinocitos y más raramente en la membrana basal. Normalmente se suelen observar depósitos de IgG, aunque es ocasiones se observan depósitos de IgA. También se suelen observar depósitos de complemento (C3) con el mismo patrón del de la IgG (**Figura 16A**). Esta técnica es positiva en un 90% de los pacientes con enfermedad activa y con una toma de biopsia adecuada. Existe un 10% de falsos negativos, normalmente por errores en la técnica. La IFD tiene un valor predictivo positivo que ronda el 100% (Mutasim et al, 2001). La sensibilidad y especificidad de cada tipo de substrato utilizado para la detección de anticuerpos puede variar según el tipo de enfermedad ampollosa (Acosta et al, 1982).

1. 2. 6. 3. *Immunoblot* e inmunoprecipitación

Con la introducción del *immunoblot* ha sido posible distinguir los distintos tipos de anticuerpos circulantes, y por lo tanto, diferenciar el PV del PF. Mediante el empleo de antígenos de extractos de hocico bovino o epidermis humana, se detecta el antígeno diana de cada tipo de pénfigo, ya que cada uno tiene un peso molecular distinto. La principal limitación que tiene esta técnica es que solamente detecta anticuerpos que reaccionan frente a epítomos desnaturalizados o secuenciales. Esto es debido a que durante el proceso de análisis se produce una desnaturalización de los antígenos.

Mediante esta técnica normalmente se detecta únicamente una banda de 130 kD, y con menor frecuencia, otra de 160 kD (antígeno del PF). Estos resultados varían en función de la fuente de antígeno empleada (Hashimoto et al, 1990). Con esta técnica se puede detectar además una banda de 85 kD, común al PV y PF y que se corresponde con la PG (Eyre et al, 1988).

La inmunoprecipitación tiene la ventaja frente al *immunoblot* que no desnaturaliza las proteínas y por ello el porcentaje de positividad aumenta de forma considerable. En el caso de PV, se detecta una banda de 210 kD (denominada complejo del PV), otra de 130 kD (Dsg3) y una tercera de 85 kD, que corresponde a la PG (Stanley et al, 1984). En un porcentaje variable de pacientes se detecta también una banda de 160 kD. Esta técnica tiene varios inconvenientes. El principal es su alto coste, además de que su tiempo de realización es mayor que el *immunoblot* y necesita el uso de radioactividad.

En la práctica clínica, estas dos técnicas no se realizan habitualmente y se utilizan más con fines de investigación, o también en aquellos casos en los que necesitamos una precisión diagnóstica mayor.

1. 2. 6. 4. *ELISA*

Las principales ventajas de esta técnica son su alta sensibilidad y rapidez, que no usa radioactividad y que permite detectar anticuerpos dirigidos contra epítomos conformacionales, ya que no desnaturaliza proteínas.

En el momento actual existen *kits* comerciales para distintas enfermedades ampollosas autoinmunes. En concreto, existe un *kit* comercial que detecta la presencia de anticuerpos contra la Dsg1 y la Dsg3, basado en el uso de moléculas recombinantes de estas moléculas sintetizadas con el sistema del baculovirus (Ishii et al, 1997).

Se han establecido los siguientes criterios diagnósticos para el PV mediante ELISA:

- Si el suero presentan anticuerpos frente a la Dsg3, independientemente de que los tenga o no para la Dsg1, será diagnóstico de PV.
- Si el suero es positivo para anticuerpos frente a Dsg3 y Dsg1, será diagnóstico de PV cutáneo-mucoso.
- Si por el contrario presenta anticuerpos contra Dsg3, será diagnóstico de PV mucoso.
- Por último, si es positivo en el suero del paciente encontramos anticuerpos frente a Dsg1 pero no contra Dsg3, entonces estaremos ante un caso de PF.

Estas determinaciones deben realizarse en fases de actividad de la enfermedad, ya que cuando los pacientes entran en remisión negativizan primero los anti-Dsg3 y pacientes con PV podrían erróneamente diagnosticarse de PF por esta técnica (Ishii et al, 1997). Varios estudios demuestran que esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad (Huang et al, 2007). Por otra parte, trabajos recientes han mostrado que el título de ELISA fluctúa paralelamente con la actividad de la enfermedad y puede ser una herramienta útil para monitorizar la actividad de misma (Cheng et al, 2002).

1. 2. 7. Tratamiento

Además del tratamiento farmacológico, son importantes una serie de factores preventivos para evitar la aparición de nuevas lesiones, y también la incorporación de varias medidas higienico-dietéticas. Por una parte, deberán evitarse traumatismos en locales, para no provocar erosiones cutáneas. En este sentido, deberá manejarse a los pacientes sin presionar la piel a la hora de atenderles, se evitará también la ingesta de alimentos sólidos, y también dejarán de emplearse adhesivos cutáneos que podrían provocar lesiones activas. También se recomendará al paciente el empleo de fotoprotectores para anular el posible papel inductor de lesiones a través de la luz ultravioleta. Se valorará conveniente la necesidad de cirugías en fases activas del PV. Es importante que estos pacientes, ingieran dietas hipercalóricas e hiperproteicas que favorezca la cicatrización de las lesiones. En pacientes con intensa afectación oro-faríngea será necesario también la colocación de una sonda nasogástrica.

Antes de la introducción de los corticoides sistémicos, el PV solía ser una enfermedad con una mortalidad muy elevada. La mayoría de los pacientes morían 5 años después del diagnóstico, debido a las infecciones bacterianas secundarias y a las pérdidas hidroelectrolíticas por las grandes erosiones cutáneas que presentaban. La introducción de los corticoides sistémicos y los inmunosupresores han mejorado considerablemente el

pronóstico del PV, aunque la morbi-mortalidad todavía sigue siendo significativa, por las frecuentes complicaciones secundarias que ocasionan estos tratamientos.

Hoy en día es aceptado que la instauración de un tratamiento temprano en el PV, una vez confirmado el diagnóstico, incluso en las formas exclusivamente mucosas, confiere un mejor pronóstico a los pacientes. El objetivo principal del tratamiento es reducir la respuesta inflamatoria y la producción de autoanticuerpos. Por tanto, independiente-mente del tratamiento que se instaure a los pacientes con PV, un punto importante en el manejo es el diagnóstico precoz. A su vez, deberemos conocer en cada caso la extensión real de cada caso, tanto desde el punto de vista clínico como también desde el punto de vista inmunológico. Conjugar estos dos aspectos requiere muchas veces pericia en el médico, quien instaurará en cada caso el fármaco y la dosis más conveniente en cada caso.

La terapia de primera línea para todos los tipos de pénfigo son los corticosteroides sistémicos. El efecto beneficioso de los corticosteroides se fundamenta en su efecto antiinflamatorio, con una acción inhibitoria en muchas vías intracelulares que intervienen en los mecanismos inflamatorios y que están implicadas en la acantólisis del PV. No es del todo conocido el efecto que tienen los corticoesteroides en la producción de autoanticuerpos. Inicialmente, el objetivo de la terapia en el PV es controlar la enfermedad con la dosis mínima eficaz de corticosteroides. La vía de administración más usada es la oral y el fármaco preferido la prednisona. Los corticosteroides actúan relativamente rápido y son relativamente seguros cuando se utilizan a dosis apropiadas durante periodos de tiempo limitados. No obstante, la mayor causa de morbi-mortalidad en el PV en la actualidad son las complicaciones derivadas del uso de dosis muy elevadas de corticoides. La mejoría clínica suele observarse a los pocos días del inicio del tratamiento, aunque las lesiones nuevas suelen dejar de aparecer a las 2-3 semanas y la curación completa suele ocurrir tras 6-8 semanas. La dosis única matutina suele más segura para tratamientos a largo plazo. La mayoría de los pacientes se controlan con una dosis de 1-2 mg/kg/día. No obstante, recientemente se ha afirmado que dosis superiores a 1 mg/kg/día no ofrecen terapéuticamente más ventajas que dosis superiores, y que en cambio producen más efectos secundarios (Ratnam et al, 1990). Por eso, la dosis inicial debe de ser de al principio de 1 mg/kg/día, generalmente en forma de prednisona oral (unos 60 mg/día). El uso de dosis mayores de 1mg/kg/día, y si los pacientes no mejoran con esta dosis después de 1 mes de tratamiento, deberemos buscar otra alternativa terapéutica (Mutasin et al, 2004). Aunque Lever propuso que si no se observa respuesta terapéutica a los 4-7 días con una dosis de

prednisona de 1-2 mg/kg/día, entonces esta dosis deberá incrementarse en un 50%, cada semana hasta controlar la enfermedad. Sin embargo, este esquema terapéutico se ha asociado a muchos más efectos secundarios y por eso suele utilizarse menos frecuentemente (Lever et al, 1977). Cuando se consigue una remisión clínica y esta es continuada se debe intentar disminuir la dosis progresivamente e idealmente se debe llegar a una dosis de mantenimiento de 5 mg/día. Una vez obtenida la remisión clínica de la enfermedad, los cambios en el título de anticuerpos medidos mediante ELISA o IFI son útiles para adaptar la dosis de prednisona (Amagai et al, 1999).

Los efectos adversos de los corticoides son numerosos e incluyen infecciones, diabetes, osteoporosis, miopatía, sangrado gastrointestinal, cataratas o toxicidad del sistema nervioso.

Se ha propuesto también la administración de corticoesteroides por vía intravenosa en forma de bolus de metil-prednisolona. No existen grandes series que permitan afirmar si hay suficiente evidencia científica para su empleo en los pacientes con PV. Por eso, deberá valorarse con precaución su empleo en pacientes con formas graves de la enfermedad (Mentink et al, 2006).

Los fármacos adyuvantes se usan normalmente en combinación con los esteroides, con el objetivo de aumentar la eficacia en el tratamiento inmunosupresor y como ahorradores de corticosteroides. Esto permite instaurar dosis de esteroides de mantenimiento más bajas y consiguiendo efectos adversos menos frecuentes. En general, los fármacos adyuvantes son más lentos en iniciar la mejoría clínica que los corticoesteroides. Normalmente se añaden cuando la enfermedad está ya controlada y se empieza a bajar la dosis de esteroides, aunque algunos autores los introducen al mismo tiempo que la prednisona. Los fármacos más usados con la azatioprina, ciclofosfamida y micofenolato mofetilo.

La azatioprina es probablemente menos efectiva que la ciclofosfamida pero se utiliza con mayor frecuencia por su mejor perfil de efectos secundarios. Ha sido ampliamente utilizada con éxito en el PV como ahorrador de corticoesteroides orales (Benoit et al, 2003). Se utiliza a dosis de 2-4 mg/kg/día (normalmente 100-300 mg/día) y sus efectos adversos más frecuentes son las náuseas, pancitopenia, pancreatitis y hepatotoxicidad.

La ciclofosfamida también ha sido usada como agente ahorrador de corticoides en casos de PV muy severos y se piensa que es el fármaco inmunosupresor más eficaz en el PV. Es un fármaco alquilante que bloquea el crecimiento celular y su actividad mitótica. Se administra en dosis de 1-3 mg/kg/día y tiene efectos secundarios como la cistitis hemorrágica,

esterilidad, alopecia, teratogenicidad, leucopenia y aumento del riesgo de neoplasias. Se ha observado que cuando se administra en forma de pulsos intravenosos cada 2 semanas o un mes la eficacia aumenta y sus efectos adversos disminuyen considerablemente (Fleischli et al. 1999; España et al, 2009).

El micofenolato mofetilo recientemente ha sido introducido en la terapéutica del PV. Este fármaco es un antimetabolito que inhibe selectivamente la inosina monofosfato deshidrogenasa, una enzima que interviene en la síntesis de purinas, un paso crítico para la proliferación de linfocitos. Debido a su perfil de seguridad y su eficacia está sustituyendo a la azatioprina como inmunosupresor adyuvante en la terapia del PV (Enk et al, 1999). Se usa a una dosis de 35-40 mg/kg/día (2 o 3 gr/día) y su efecto adverso mas frecuente son las molestias gastrointestinales, que raramente obligan a suspender el fármaco. Estudios realizados con un número aceptable de pacientes han mostrado que el micofenolato mofetil es un fármaco efectivo y seguro para su uso combinado con corticoides orales en el PV (Mimouni et al, 2003), con una eficacia ligeramente superior a la observada con la administración de azatioprina (Beissert et al, 2006). Aunque es cuatro veces más caro que la azatioprina, su mayor tolerancia y seguridad le convierten el fármaco de elección como ahorrador de corticoides.

Existen algunos casos publicados de pacientes con PV tratados con éxito con ciclosporina, aunque corresponden a series de casos con muy pocos pacientes (Barthelemy et al, 1988). No obstante, hoy en día la opinión más extendida es que este fármaco no es de gran eficacia para el tratamiento del PV (Ioannides et al, 2000).

La plasmaféresis es útil para disminuir rápidamente el título de anticuerpos circulantes, y debe tenerse en consideración en formas graves de PV donde no ha habido respuesta a la combinación de corticoides e inmunosupresores (Bystrytn et al, 1996). Además, su empleo será beneficioso también en aquellos casos en los que la actividad de la enfermedad es importante, con un título elevado de SIE circulantes. También, puede indicarse en aquellos pacientes en los que no podamos emplear fármacos inmunosupresores, como ocurre por ejemplo en mujeres embarazadas. La inmunosupresión concomitante con corticoesteroides y ciclofosfamida previene un aumento de rebote post-plasmaféresis en la producción de autoanticuerpos.

Las inmunoglobulinas intravenosas a dosis altas han sido usadas con éxito en casos de PV refractarios (Jolles et al, 2001). Recientemente se ha demostrado que su administración

permite reducir de forma significativa el título de anticuerpos circulantes frente a la Dsg1 y 3 del tipo IgG4 (Green et al, 2008).

En los últimos años se han empezado a utilizar fármacos biológicos para el tratamiento del PV. Entre ellos destaca el anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino anti-CD20 (Rituximab) comercializado con el nombre de Mabthera®. El Rituximab deplecciona transitoriamente los linfocitos B CD20-positivos de la circulación. Ha sido empleado en más de un millón de pacientes con linfoma no Hodgkin CD20-positivo y se han observado pocos efectos adversos graves. El Rituximab se administra vía intravenosa a dosis de 375 mg/m² semanalmente durante 4 semanas. Según algunos estudios, el Rituximab puede ser considerado una opción de tratamiento válida en pacientes con PV extenso, recalcitrante y que amenace la vida. Este fármaco ha mostrado un buen perfil de seguridad y tolerabilidad, con respuestas duraderas después de un solo ciclo de tratamiento en pacientes con PV (Cianchini et al, 2007; España et al, 2004). Aunque se ha descrito algún caso aislado de leucoencefalopatía en pacientes tratados con este fármaco, su número tan reducido no permite todavía sacar conclusiones definitivas. A pesar de todo, su elevado precio y sus potenciales efectos adversos a largo plazo hacen que su uso deba estar restringido a pacientes graves que no hayan respondido a otros tratamientos.

Existen numerosas referencias en la literatura sobre otros fármacos empleados en el PV, pero los casos presentados son anecdóticos y las series presentadas muy cortas. Entre ellos, están la combinación de tetraciclinas y nicotinamida (Fimiani et al, 1997), la dapsona (Heaphy et al, 2005), la minociclina (Gaspar et al, 1996), la prostaglandina E2 (Morita et al, 1995), la fotoféresis extracorpórea (Gollnick et al, 1993), los inhibidores de proteinasas (Grando, 1992), sales de oro (Pandya et al, 1998) y la IL-10 (Schaller et al, 1990).

2. OBJETIVOS

Analizando los datos expuestos, podemos concluir que no está totalmente aclarado el mecanismo implicado en la acantólisis suprabasal del PV. A su vez, los estudios que hemos comentado anteriormente, parecen indicar que en esta enfermedad podrían ser varios los procesos que cooperan de forma coordinada para que el resultado final sea la rotura de los desmosomas. Por todo ello, en el presente trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos con el fin de contribuir a clarificar más los interrogantes existentes en la etiopatogenia del PV:

1. Conocer si las isoformas de los receptores HER tienen un papel relevante en la acantólisis del PV en un modelo murino. Para ello, hemos estudiado mediante inmunohistoquímica la expresión de p-HER1, p-HER2, p-HER3 en la epidermis de los ratones C57 a los que administraremos IgG-SN o IgG-PV. A su vez, hemos analizado cuál es el efecto del pretratamiento de los ratones con un inhibidor de la actividad quinasa de las isoformas HER (erlotinib), tanto clínica como histológicamente; y en concreto, en qué medida la inhibición de la actividad tirosina quinasa de los receptores HER, modula las diferentes vías que pueden ponerse en marcha en los queratinocitos de la epidermis de los ratones con esta enfermedad.
2. También hemos investigado si ligandos de los receptores HER (EGF, TGF- α , BTC, NRG-3 y AR) participan en la activación de los mismos en nuestro modelo de PV. Este objetivo lo hemos llevado a cabo mediante la realización de estudios de inmunohistoquímica, con el fin de observar expresión de esos ligandos en la capa basal de la epidermis de los ratones tratados.
3. Hemos analizado también el papel que pueden tener en el PV ciertas quinasas, como mTOR, Akt y Src, las cuales son conocidas por su papel fundamental en el control de la supervivencia celular. Para ello, inicialmente hemos estudiado la expresión de sus formas activas en la epidermis de los animales a los que previamente habíamos inyectado IgG-SN o IgG-PV. Posteriormente, hemos investigado cómo influye en la enfermedad de los ratones la actividad de estas quinasas, mediante el pretratamiento con inhibidores específicos (rapamicina, inhibidor de mTOR; PP1, inhibidor de Src).
4. Conscientes del papel que puede tener el mecanismo de apoptosis dentro de la patogenia del PV, nos interesó estudiar en nuestro modelo de PV la relación existente entre apoptosis/acantólisis. Para ello, inicialmente determinamos la cronología de ambos procesos, observando en qué momento empieza a aparecer cada uno de ellos después de

la administración a los ratones de IgG-PV. Observamos en cada caso la presencia o no de acantólisis, así como el desarrollo de apoptosis mediante la técnica de TUNEL. De forma adicional, analizamos cómo modulan el proceso de apoptosis algunos inhibidores utilizados en este proyecto (erlotinib, PP1, rapamicina e inhibidor pan-caspasas).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. Obtención de los sueros

Para la realización de este trabajo se han empleado cuatro sueros distintos procedentes de tres enfermos de PV cutáneo-mucoso y un control sano.

- Paciente 1 (PV1):

Paciente mujer de 28 años diagnosticada de PV en enero de 2001. En marzo de 2002 debido un empeoramiento de la enfermedad a pesar de recibir tratamiento con sales de oro y 90 mg/día de prednisona, fue ingresada en régimen hospitalario. Presentaba lesiones erosivas en mucosa oral y genital y en casi toda la superficie cutánea. Mostraba un título de SIE de 1/320. Se inició tratamiento con 5 ciclos de plasmaféresis (momento de la obtención del suero), con la administración posterior, en los 3 días consecutivos, de 1 g, 500 mg y 250 mg de 6-metilprednisolona respectivamente.

- Paciente 2 (PV2):

Paciente varón de 61 años, previamente diagnosticado de PV en 1999 en otro centro, que acudió a nuestro centro en abril de 2002. Presentaba lesiones ampollosas en tórax y región facial a pesar de haber recibido múltiples tratamientos (corticoides orales, sales de oro, azatioprina, micofenolato mofetilo, metotrexato y ciclosporina). Los títulos de SIE que presentaba eran de 1/640. El paciente fue ingresado para realizar 5 ciclos de plasmaféresis. En ese momento se obtuvo el suero para este estudio y después del último ciclo, se administró un bolus de ciclofosfamida. Durante ese ingreso recibió tratamiento con 1 g/día de micofenolato mofetilo y prednisona 100 mg/día.

- Paciente 3 (PV3):

Paciente varón de 39 años diagnosticado de PV en 1999. Fue valorado por primera vez en nuestro centro en marzo de 2003. Había recibido tratamiento previo con corticoides orales a dosis elevadas junto con azatioprina y 5 sesiones de plasmaféresis sin control de la enfermedad. En el momento de la visita tomaba 45 mg/día de deflazacort. En la exploración física se observaban lesiones erosivas en cabeza, tronco, extremidades y mucosa oral, afectando aproximadamente un 70% de su superficie corporal. El título de SIE que presentaba era de 1/320. Se instauró entonces tratamiento con 3 sesiones más de plasmaféresis (momento de la obtención del suero) junto con prednisona 80 mg/día.

- Control sano (suero normal: SN)

Se obtuvo del banco de sangre de la Clínica Universitaria de Navarra, de donante de plaquetas.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes para la utilización de sus sueros con fines científicos.

3. 2. Caracterización de los sueros

Para la caracterización de los sueros de los pacientes con PV, se siguieron los criterios establecidos en la literatura (Ruocco et al, 2005).

3. 2. 1. Inmunofluorescencia indirecta

Se testaron los 4 sueros empleados, con el fin de determinar el título de anticuerpos circulantes, siguiendo la técnica descrita por diferentes autores (Emery et al. 1995; Mascaro et al, 1997; Marquina et al, 2008). El substrato usado fue el esófago de mono, utilizando IgG anti-humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ASA, Byosystems, Barcelona, España). En todos los casos se observaron depósitos de IgG en los dos tercios inferiores del epitelio (**Tabla 3**).

3. 2. 2. ELISA

El estudio de ELISA fue realizado en el laboratorio de Inmunología de la Clínica Universitaria de Navarra, con un *kit* comercial (Mesacup Dsg-1 & Dsg-3 ELISAs, MBL, Nagoya, Japan), con los siguientes valores de referencia: negativo < 7, positivo débil 7-20, positivo > 20. Se observaron la presencia de anticuerpos anti-Dsg 1 y 3 en los 3 pacientes afectados de PV, siendo negativos en el control sano (**Tabla 3**).

3. 2. 3. Inmuprecipitación

El estudio de inmuprecipitación, para una mejor caracterización de los sueros que deseamos emplear en este estudio, se realizó con la fracción extracelular de la Dsg-1 y 3, que se corresponden con las bandas de 75 kD y 66 kD respectivamente. El procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología del Dr. LA Díaz (Wisconsin, EEUU) siguiendo el método convencional descrito (Ding et al, 1999). Las bandas resultan de se muestran en la **Figura 16**.



Paciente 1. Lesiones erosivas y ampollosas localizadas en tronco y extremidades.



Paciente 2. Lesiones de PV, consistentes en erosiones extensas y ampollas que cubren una amplia zona de la superficie cutánea.



Paciente 3 Este paciente presentaba extensas lesiones en cara, tronco y extremidades, observándose amplias zonas erosionadas.

	SN	PV1	PV2	PV3
IFI	Negativo	1/320	1/640	1/320
ELISA				
Ac-anti Dsg1	Negativo	60 U/ml	189 U/ml	77 U/ml
Ac-anti Dsg3	Negativo	173 U/ml	67 U/ml	160 U/ml
Inmunoprecipitación				
Banda de 75kD (Dsg1)	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Banda de 66 kD (Dsg3)	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 3: Valores de IFI, ELISA e inmunoprecipitación de los sueros empleados en nuestra experimentación.

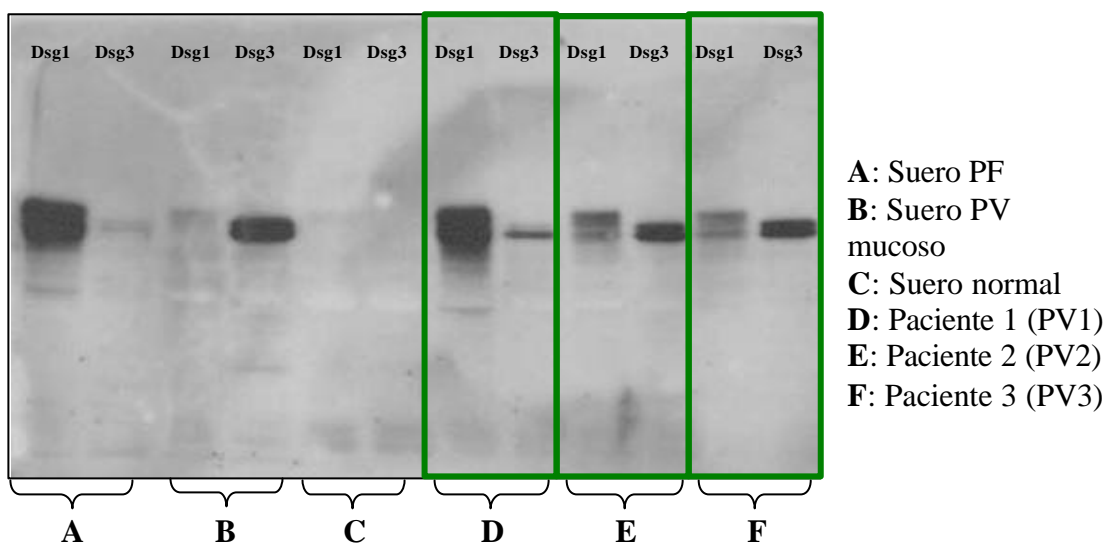


Figura 16: Imagen de las bandas obtenidas mediante la técnica de inmunoprecipitación de los distintos sueros empleados.

3. 3. Purificación de IgG

La técnica que hemos seguido para la purificación de fracciones de IgG corresponde a la seguida por la mayoría de los autores con pequeñas modificaciones (España et al, 1997).

Los sueros fueron obtenidos mediante extracciones de sangre periférica como parte del tratamiento de plasmaféresis. Una vez extraídas las muestras se congelaron a -40°C hasta su utilización. Una vez descongelado el plasma a 4°C , se repartió en tubos Falcon, añadiendo posteriormente trombina (7 U/ml plasma) (Sigma). A continuación, se introdujeron durante 15-30 minutos en un baño de 37°C en agitación suave. Se separó el sobrenadante del coágulo formado con pipetas Pasteur. Posteriormente se precipitó con el mismo volumen de persulfato amónico saturado al 100% ($\text{pH } 7,3$), añadiéndolo lentamente y dejándolo durante 20 minutos en agitación. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 rpm

(17400G) (Rotor SS-34), eliminándose el sobrenadante y recogiendo el precipitado al que se añadieron 4 ml de PBS para que se disolviese. Con el fin de eliminar el persulfato de amonio, se realizó diálisis durante 24 horas, a 4°C y en agitación, recambiando el medio de PBS a las 12 horas.

La purificación de IgG se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad (ÄKTA™ FPLC™, Amersham Biosciences), filtrando el sobrenadante obtenido en una columna de proteína A (Pharmacia Uppsala, Sweden). Las fracciones de IgG unidas a la proteína A, fueron eluidas con glicina (pH 3) y neutralizadas con Tris-base. Una vez obtenida la inmunoglobulina, se concentró mediante ultrafiltración (8-kD) (Amicon, Lexington, Massachusetts, EEUU). Finalmente, la concentración de IgG se midió mediante nefelometría empleando IgG antihumana de cabra, obteniendo unos valores comprendidos entre 6300 mg/dl y 14000 mg/dl (Beckman Array 360 System; Beckman Instruments Kit, Clinical Instruments Division), almacenándola a -20°C hasta su uso.

3. 4. Modelo de experimentación animal

Para la experimentación se utilizaron ratones C57BL/6J recién nacidos de 24-48 horas de vida, con un peso comprendido entre 1.5-1.9 g.

Las colonias de progenitores fueron adquiridas de *The Jackson laboratory* (Maine, USA) y fueron mantenidas en el animalario de la Universidad de Navarra. Las dosis administradas tanto de fracciones IgG (IgG-PV e IgG-SN) como de los distintos inhibidores se calcularon en función del peso de los animales.

La experimentación con ratones se llevó a cabo con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra, basada en las directrices correspondientes de la Unión Europea y en las normas establecidas por el Gobierno de Navarra.

3. 5. Experimentos de transferencia pasiva

Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado para cada suero (3 ratones por cada suero (3 ratones por cada suero)). Se administró intradérmicamente la IgG purificada de los pacientes en el dorso de los ratones, con una aguja de 29 G, con una concentración de 2 mg de IgG por gramo de peso del ratón (en un volumen no superior a 50 µl/inyección), siguiendo la técnica descrita por otros autores (Ding et al, 1997; (Mascaró et al,1997).

Durante este procedimiento se delimitó el área tratada con un rotulador indeleble, para posteriormente poder reconocer la zona inyectada y coger muestras de piel.

La ausencia o presencia de enfermedad se determinó al cabo de 12 horas (basándonos en la cronología de aparición de lesiones en estudios realizados en nuestro laboratorio) mediante la comprobación de la existencia del signo de Nikolsky empleando la siguiente puntuación: - (negativo), + (despegamiento epidérmico de menos del 33% del área inyectada), ++ (despegamiento epidérmico entre el 33 y 66% del área inyectada) y +++ (despegamiento epidérmico mayor del 66% del área tratada).

Posteriormente, se sacrificaron los ratones mediante decapitación. De la zona central del área tratada se obtuvieron muestras que se fijaron en un fijador de zinc (0.1M Tris buffer pH 7.4, 0.5 g acetato cálcico, 5.0 g acetato de zinc, 5.0 g cloruro de zinc, pH 6.7-7.0), para posteriormente teñirlas con hematoxilina-eosina y realizar estudios histopatológicos convencionales así como de inmunohistoquímica. La zona periférica de piel del área tratada fue congelada en nitrógeno líquido para realización de IFD. Se obtuvieron también muestras de sangre de los ratones tras la decapitación para realización de IFI (**Figura 17**).

Desde que se separaron de su madre hasta su sacrificio (unas 17 horas), los ratones se mantuvieron en una caja compartimentada en una habitación a 25°C.

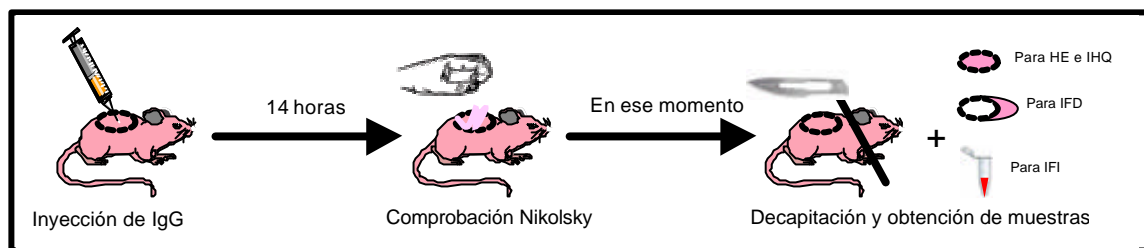


Figura 17: Esquema en el que se muestra el procedimiento llevado a cabo durante los experimentos de transferencia pasiva de IgG.

3. 6. Administración de inhibidores

La administración de inhibidores se realizó 2 horas antes de la inyección de las fracciones de IgG, basándonos en un estudio previo de nuestro grupo, mediante inyecciones intradérmicas en el dorso de los animales con una aguja de 29G. Se inyectaron 12 ratones por inhibidor (3 ratones por cada uno de los 4 sueros). La zona inyectada se delimitó con un rotulador indeleble y posteriormente se administró la IgG-PV o la IgG-SN dentro de la zona

marcada. Las muestras se recogieron a las 14 horas de la inyección de IgG. Se administraron 4 inhibidores diferentes (**Figura 18**).

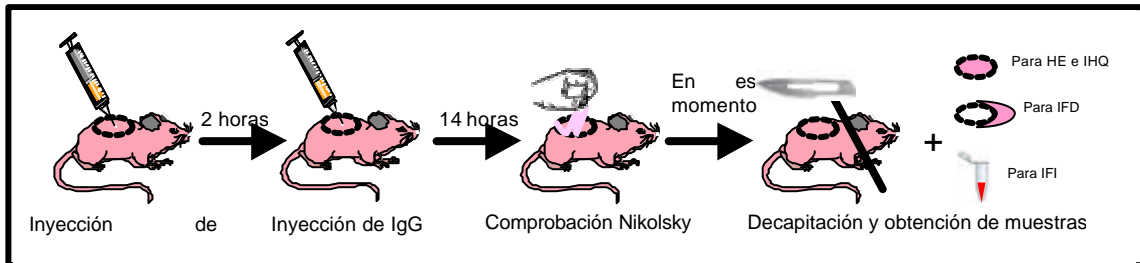


Figura 18: Esquema en el que se muestra el procedimiento llevado a cabo durante los experimentos de inyección de inhibidores y transferencia pasiva de IgG.

3. 6. 1. Erlotinib

El Erlotinib es una quinazolina de bajo peso molecular de administración oral que inhibe reversible y selectivamente la actividad tirosín-quinasa del EGFR compitiendo con la adenosina trifosfato para su unión a este receptor en el dominio quinasa. Es un inhibidor fundamentalmente de HER1, aunque se ha visto que podría inhibir también la HER2 Y HER3 (Kim et al, 20002; Schaefer et al, 2007) (**Figura 19**).

Este fármaco está comercializado bajo el nombre de Tarceva® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA and OSI Pharmaceuticals, Melville, NY). El fármaco nos fue amablemente dispensado por OSI Pharmaceuticals y su pureza fue de >95%. Para su inyección fue diluido con DMSO al 10% y Pluronyc al 0,1%. La dosis utilizada fue de 100 µg/g de peso del animal en inyección intradérmica según estudios previamente publicados (Pollack et al, 1999) (**Tabla 4**).

El Erlotinib fue aprobado por la FDA en Noviembre de 2004, y por la *European Medicinal Evaluation Agency* (EMA) en Octubre de 2005, para el tratamiento de cáncer de pulmón avanzado de células no pequeñas resistente a quimioterapia. En noviembre de 2005 la FDA lo aprobó también para el cáncer de páncreas avanzado en combinación con gencitabina en pacientes sin tratamiento previo de quimioterapia. La dosis máxima tolerada en humanos es de 150 mg/día. Los efectos secundarios que limitan las dosis máximas son la erupción cutánea y la diarrea.

Las terapias anti-EGFR son buenas opciones para su combinación con otros tratamientos como quimioterapia o radioterapia en varios tipos de tumores, debido a su tolerable perfil de

seguridad. No existen estudios que analicen el efecto del Erlotinib en procesos con una base autoinmune.

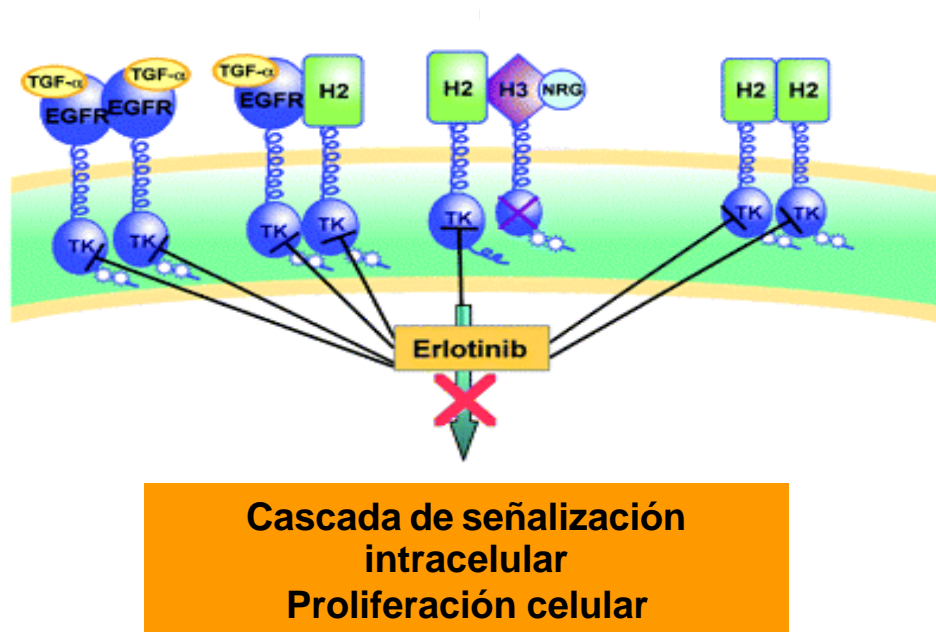


Figura 19: Esquema donde se muestra la inhibición de los distintos homodímeros y heterodímeros de ErbB por parte del Erlotinib. (Modificado de Mendelsohn et al, 2006).

3. 6. 2. Rapamicina

La Rapamicina es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* con propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas. Gracias a sus propiedades supresoras de la activación de linfocitos, su uso fue aprobado como inmunosupresor para la prevención del rechazo de trasplante alogénico renal. Esta comercializado en España con el nombre de Rapamune® de laboratorios Wyeth Farma.

No está totalmente aclarado el mecanismo por el cual este fármaco actúa como inhibidor de la mTOR. Parece ser que la rapamicina, se une a la inmunofilina FKPB12, formando un complejo que específicamente interactúa con la mTOR inhibiendo la cascada de señalización posterior (Sehgal et al, 1975). El complejo rapamicina–FKPB12 podría actuar alterando la composición y/o conformación de los complejos mTOR (**Figura 20**).

Los inhibidores de la mTOR son normalmente bien tolerados y sus efectos adversos más frecuentes son las reacciones cutáneas, la estomatitis, mielosupresión y anomalías metabólicas. Estas reacciones son transitorias y reversibles con la interrupción del fármaco.

En nuestra experimentación el fármaco se compró en Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y la dosis utilizada fue de 5 µg/g de peso del animal según estudios previamente publicados (Teachey et al, 2006) (**Tabla 4**).

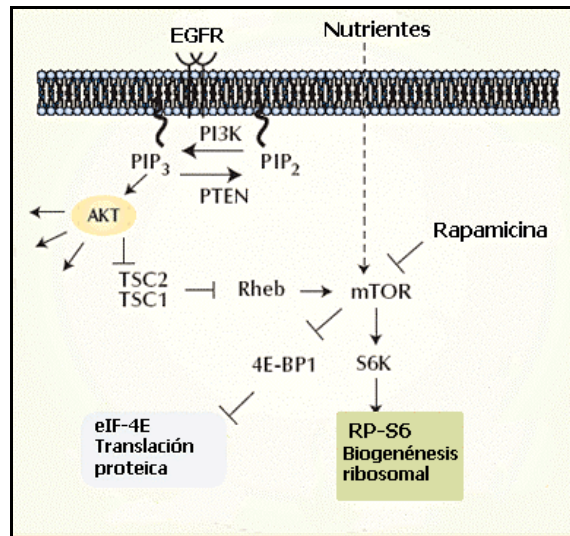


Figura 20: Esquema del mecanismo de acción de la rapamicina (modificado de Mellinghoff et al, 2004)

3. 6. 3. PP1 (4-Amino-1-*tert*-butil-3-(1'-naftil)pirazolo[3,4-d]pirimidina)

El PP1 es una pirazolopirimidina sintética y un nuevo, potente, y selectivo inhibidor de las tirosín-quinazas de la familia Src. El inhibidor fue obtenido de laboratorios Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y para su inyección fue diluido con DMSO al 20%.

La dosis utilizada fue de 1 µg/g de peso del animal según estudios previamente publicados (Jadhav et al, 2007) (**Tabla 4**).

3. 6 .4. Inhibidor de la caspasa II (cpm-VAD-CHO)

Es un inhibidor pan-caspasa reversible. Su acción se centra en la inhibición global de la acción de todas las caspasas que intervienen en el proceso de apoptosis. El inhibidor fue obtenido de laboratorios Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y para su inyección fue diluido con DMSO al 10%.

La dosis utilizada fue de 1,6 µg/g de peso del animal según estudios previamente publicados (Imao et al, 2006) (**Tabla 4**).

En ningún caso observamos en los animales problemas de toxicidad o fallecimiento con las dosis empleadas.

INHIBIDOR	COMPAÑÍA	CATÁLOGO	DOSIS	DISOLVENTE
Erlotinib	OSI Pharmaceuticals	-----	100 µg/g	DMSO
Rapamicina	Calbiochem	553210	5 µg/g	DMSO
PP1	Calbiochem	529579	1 µg/g	DMSO
Inhibidor caspasa II	Calbiochem	218830	1,6 µg/g	DMSO

Tabla 4: Esquema en el que se muestran las características de los distintos inhibidores utilizados.

3. 7. Hematoxilina-eosina

Cada una de las muestras obtenidas de piel de ratón fue fijada en un fijador de zinc durante 24-48 horas, incluyéndose posteriormente en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm y posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La valoración del grado de acantólisis se determinó por dos observadores, siguiendo el método “doble ciego”, de acuerdo con la siguiente escala: negativo (ausencia de acantólisis en toda la muestra), + (acantólisis localizada en un tercio de la preparación), ++ (acantólisis localizada en dos tercios de la preparación) y +++ (acantólisis en la epidermis superior a dos tercios de la superficie de la muestra).

3. 8. Inmunofluorescencia directa

Esta técnica se realizó con el fin de determinar si la IgG-PV inyectada se unía a los queratinocitos de la epidermis del ratón. Las muestras de piel de ratón del área más periférica que había sido inyectada fueron congeladas en OCT (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA) utilizando nitrógeno líquido (**Figuras 17 y 18**).

Posteriormente se realizaron cortes de 4-5 µm con un criostato, por duplicado. A continuación se añadieron a cada uno de ellos 20 µl de IgG anti-humana obtenida de conejo y conjugada con FITC (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), incubándolos durante 60 minutos en caja húmeda. Una vez concluido dicho tiempo, se realizó un lavado de arrastre con el *buffer* (sal tampón, Analema, España) y se sumergieron las muestras en el *buffer* durante 5 minutos seguidas de un nuevo lavado de arrastre. Este último paso se repitió en dos ocasiones. Finalmente las muestras se cubrieron con glicerina a 60°C y un cubreobjetos. Para la valoración de la unión de la IgG-PV a la superficie de los queratinocitos, se utilizó un microscopio convencional de inmunofluorescencia (Zeiss, Germany).

La intensidad de la fluorescencia fue valorada por dos observadores, según el método “doble ciego” y se valoró como negativa (-) o positiva (+).

3. 9. Inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica se realizó para demostrar la presencia de IgG-PV circulante en la sangre del ratón después de la transferencia pasiva.

La muestra de sangre fue recogida de cada ratón tras su decapitación. Como sustrato para la IFI se utilizó esófago de mono (ASA, BioSystems SA, Barcelona). Se prepararon diluciones dobles (1/40 y 1/80), añadiéndose por duplicado, a los diferentes cortes. Después de 30 minutos se realizaron dos lavados con TBS de 10 minutos cada uno de ellos. Posteriormente se añadieron 50 µl de IgG anti-humana obtenida de conejo y conjugada con FITC, a una dilución de 1:20 (ASA, BioSystems, Barcelona, España), durante 30 minutos. Por último, se realizaron dos lavados con TBS durante 10 minutos. La valoración de los resultados se realizó de la misma forma mencionada en el estudio de la IFD.

3. 10. Inmunohistoquímica

Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron en colaboración con el departamento de Histología de la Universidad de Navarra y la empresa Dominion Pharmakine (Zamudio, Vizcaya).

Las muestras de piel de ratón obtenidas del interior de la zona inyectada con un inhibidor previo y la IgG (IgG-SN o IgG-PV) según el caso fueron incluidas en parafina tras su fijación en un fijador de zinc (**Figuras 17 y 18**).

Se construyó un *microarray* de tejido para cada muestra. Se obtuvo un cilindro de tejido de 2 mm de cada bloque de tejido incluido en parafina. Los cortes originales teñidos con hematoxilina-eosina de todos los bloques fueron primeramente revisados bajo microscopio para seleccionar las áreas representativas de la piel. Los cilindros fueron colocados en un recipiente de *microarray* utilizando un *Tissue Microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD). Todas las muestras estuvieron representadas por cuadruplicado. El *microarray* de tejido fue cortado en secciones de 4 µm de espesor. Posteriormente, las muestras se desparafinaron con dos baños de citosol (o similar) de 10 minutos cada uno y se hidrataron en pases sucesivos de alcoholes de gradación decreciente (100%, 96%, 80% y 70%) hasta agua. Todos los cortes se colocaron en un tampón de PBS. Posteriormente los cortes fueron colocados bien en un tampón citrato 10mM (pH 6.0) o en un tampón EDTA 1 mM (pH 8.0)

y calentados en un microondas (Balay W-2112, 1150-700W; Madrid, España) durante 15 minutos a la máxima potencia y calentados en microondas durante 5 minutos a la máxima potencia y 15 minutos a media potencia.

Después, se dejaron enfriar las muestras en el tampón de desenmascaramiento, y finalmente se lavaron en agua corriente. La actividad extrínseca de la peroxidasa se agotó introduciendo las muestras en agua oxigenada al 3% en agua destilada durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron los portas 5 minutos en agua destilada. Tras este paso, los portas se lavaron en la solución de lavado adecuada para cada anticuerpo primario (ver tabla) y se secó el exceso de buffer. En los casos en los que el anticuerpo primario fue de ratón, fue necesario un bloqueo de 1 hora con la fracción FAB (Fab anti -mouse Jackson Laboratories 1/ml) para que el anticuerpo secundario no se nos uniese posteriormente a los anticuerpos murinos presentes inicialmente en el tejido. Posteriormente se cubrió la muestra con suero normal de cabra diluido 1:20 (DAKO, Glostrup, Denmark) en PBS, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Luego se escurrió el suero y se aplicó el anticuerpo primario a la dilución adecuada (ver tabla) y se incubó a 4° C toda una noche en cámara húmeda.

Las características de los anticuerpos policlonales utilizados se exponen en la **Tabla 5**.

Tras este paso se procedió a un nuevo lavado con la solución de lavado y se secó el exceso de solución. El sistema de detección usado fue el método Envision (Dako, CA, USA, K4011) que consiste en una IgG de cabra anti-conejo o anti-ratón ligada a un polímero de dextrano marcado con peroxidasa. Se aplicó el Envision-HRP adecuado (anti-ratón o anti-conejo), dependiendo de la especie de la que se obtuvo el anticuerpo primario (ver tabla) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se lavaron abundantemente con la solución de lavado y se secó el exceso de solución. Más tarde se aplicó la solución de revelado para la enzima peroxidasa vector VIP (Vector, UK, SK4600), precipitado de color púrpura, y se incubó bajo microscopio hasta que apareció el marcaje. Tras este paso los portas se lavaron con agua del grifo y las muestras fueron cubiertas con hematoxilina de Harris (contra-tinción). Por último, fueron lavadas abundantemente con agua del grifo, deshidratadas (con pases progresivos por alcohol 96%, alcohol absoluto y xilol) y montadas en DPX.

ANTICUERPO	COMPAÑIA (CÓDIGO)	DILUCIÓN	FIJADOR	ESPECIE	MICROONDAS
p-EGFR	Cell signalling (2235)	1:100	Zinc	Conejo	Si: EDTA
p-HER2	Cell signalling (2241)	1:50	Zinc	Conejo	Si: EDTA
p-HER3	Cell signalling (4791)	1:100	Zinc	Conejo	Si: EDTA
p-mTOR	Cell signalling (2976)	1:50	Zinc	Conejo	Si: Citrato
p-Src	Cell signalling (2101)	1:100	Zinc	Conejo	Si: EDTA
p-Akt	Cell signalling (3787)	1:50	Zinc	Conejo	Si: Citrato
Betacelulina	R&D Systems (AF1025)	1:50	Zinc	Cabra	Si: Citrato
EGF	R&D Systems (AF2028)	1:20	Zinc	Cabra	Si: EDTA
Anfiregulina	R&D Systems (AF989)	1:20	Zinc	Cabra	Si: EDTA
NRG- 3	R&D Systems (AF753)	1:100	Zinc	Cabra	Si: EDTA
TGF-a	Gene Tex (GTX16768)	1:200	Zinc	Ratón	Si: EDTA

Tabla 5: Características de los anticuerpos utilizados en la experimentación.

3. 11. Técnica TUNEL

Para evaluar los mecanismos de apoptosis, después de la inyección de IgG-PV y IgG-SN, y con cada inhibidor más IgG-PV o IgG-SN, las muestras de piel de ratón fueron fijadas en un fijador de zinc como se describe anteriormente.

La técnica TUNEL fue llevada a cabo siguiendo la instrucciones del fabricante para *ApogTag® Plus peroxidase in situ apoptosis detection kit* (Chemicon, USA, S7101) y usando el Vector Vip como substrato de la peroxidasa (Vector, UK, SK4600). La cuantificación del número de células TUNEL positivas en la capa basal se realizó mediante el conteo del número de células positivas del total de células basales por campo de 40 aumentos por dos observadores distintos.

Se realizó también un estudio de la cronología de la apoptosis y acantólisis administrando IgG-PV a los ratones y sacrificándolos al cabo de 15, 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 11h y 12h. Se tomaron muestras para su estudio con hematoxilina-eosina y para la realización de la técnica TUNEL.

3. 12. Análisis de las imágenes

La proporción de células teñidas por el anticuerpo en la capa basal (área de queratinocitos teñidos en la capa basal/ área total de queratinocitos basales) fue calculada usando el software de análisis de imágenes Matlab (The MathWorks Inc, Natick, NA, USA).

Las imágenes fueron adquiridas por un microscopio automatizado Axioplan 2ie microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) conectado a una cámara Zeiss Axio Cam ICc3, mediante software Meta-Morph (Molecular Devices, Downing-town, PA). Los algoritmos de segmentación fueron diseñados por el Dr Ortiz de Solórzano de Laboratorio de Morfología y Imagen (CIMA, Universidad de Navarra) (Salas et al, 2008).

3. 13. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Los datos que mostraban una distribución normal después del análisis con el test Shapiro-Wilks fueron analizados usando la *t* de *Student* para muestras independientes. Cuando las variables no seguían una distribución normal se realizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. La significación estadística se estableció cuando la $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4. 1. Test de patogenicidad de las fracciones IgG de los sueros de los pacientes en los ratones C57

Inicialmente, quisimos comprobar que los sueros que deseábamos utilizar en nuestro estudio reproducían la enfermedad en el ratón, tanto clínica como inmunológicamente.

4. 1. 1. Administración de fracciones IgG de suero control (IgG-SN)

Doce horas después de la inyección de IgG-SN no se observó enfermedad clínica (signo de Nikolsky negativo) (**Figura 21A**) ni histológica (**Figura 21B**) en ninguno de los 3 ratones estudiados. Los estudios de inmunofluorescencia para IgG (tanto IFD como IFI) fueron negativos (**Tabla 6**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
R _{sn1}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
R _{sn2}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
R _{sn3}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-

Tabla 6: Hallazgos tras la administración de IgG-SN en los ratones C57.

4. 1. 2. Administración de fracciones IgG de suero de pacientes con PV (IgG-PV)

En todos los ratones a los que se administró la IgG-PV se observó la enfermedad a las 12 horas, tanto desde el punto de vista clínico (**Figura 21c**) como histológico (**Figura 21d**). En todos los ratones se detectó la presencia del signo de Nikolsky (+++/+++). En el estudio histopatológico se detectó acantólisis suprabasal en todas las muestras (+++/+++). Todas las muestras de la piel perilesional obtenida mostraron depósitos pericelulares de IgG en las células basales y parabasales en los estudios de IFD (**Tabla 7**). El análisis de IFI fue positivo al menos a un título de 1/80 (**Tabla 7**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
R _{pv1}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv2}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv3}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv4}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv5}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv6}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv7}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv8}	+++	Acantólisis: +++	+	+
R _{pv9}	+++	Acantólisis: +++	+	+

Tabla 7: Hallazgos tras la administración de IgG-PV en los ratones C57.

4. 2. Estudio de la participación de los receptores HER y sus ligandos en el PV

Para averiguar cómo se expresan los distintos miembros de la familia de los receptores HER, estudiamos mediante inmunohistoquímica la expresión de las formas activadas de tres de sus isoformas (p-HER1, p-HER2 y p-HER3) en la epidermis de los ratones después de administrar IgG-SN o IgG-PV. Así mismo, investigamos la expresión de 5 ligandos de los receptores HER (*epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor alpha* (TGF- α), betacelulina (BTC), anfiregulina (AR) y neuroregulina 3 (NRG-3) tras la administración de IgG-SN o IgG-PV a los ratones.

4. 2. 1. Administración de fracciones IgG de suero control (IgG-SN)

En los estudios de inmunohistoquímica de todas las muestras observamos una expresión dispersa y ligera en la capa basal de la epidermis de p-HER1, p-HER2 y p-HER3 tras la administración de IgG-SN (**Figura 22**). Todos los ligandos estudiados mostraron una ligera expresión pericelular en los queratinocitos de la capa basal de los ratones tratados con IgG-SN (**Figura 23**).

4. 2. 2. Administración de fracciones IgG de suero de PV (IgG-PV)

La expresión de p-HER1, p-HER2 y p-HER3 fue intensa en las células de la capa basal de la ampolla epidérmica de los ratones tras la administración de IgG-PV (**Figura 22**). Cuando realizamos en análisis cuantitativo de esta expresión comparando la expresión tras la inyección con IgG-SN respecto a la administración de IgG-PV, observamos un incremento estadísticamente significativo de las tres isoformas ($p < 0.05$) (**Gráfica 1**).

La expresión de BTC, TGF- α y EGF fue intensa en la capa basal de la epidermis de ratones inyectados con IgG-PV, siendo este incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$), comparándolo con la expresión tras la administración de IgG-SN (**Figura 23**) (**Gráfica 2**). Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de NRG-3 y AR tras la inyección de IgG-PV (**Figura 23**).

4. 3. Estudio de la participación de las vías de señalización intracelular activadas por los receptores HER en el PV

Para averiguar en el PV si la activación de los miembros de la familia de los receptores HER se correlacionaba con la activación de varias moléculas *downstream* de las vías de

señalización intracelular que ponen en marcha estos receptores, estudiamos mediante inmunohistoquímica la expresión de las formas activadas de p-Akt, p-mTOR y p-Src en la epidermis de los ratones después de administrar IgG-SN o IgG-PV.

4. 3. 1. Administración de fracciones IgG de suero control (IgG-SN)

La expresión de p-Akt fue nula en las células de la capa basal, apareciendo únicamente en la capa granulosa de la epidermis de los ratones tras la administración de IgG-SN (**Figura 24**), mientras que la expresión de p-mTOR fue dispersa y de intensidad media en la capa basal (**Figura 24**). Por otra parte, la expresión de p-Src fue ligera y dispersa en la capa basal tras la administración de IgG-SN (**Figura 25**).

4. 3. 2. Administración de fracciones IgG de suero de PV (IgG-PV)

La expresión de p-Akt no varió en las células de la capa basal de la epidermis de los ratones tras la administración de IgG-PV (**Figura 24**) (**Gráfica 3**). La expresión de p-mTOR y p-Src aumentó de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (**Figuras 24 y 25**, respectivamente) (**Gráficas 3 y 4** respectivamente) con una localización en las células basales de la epidermis cuando los ratones fueron inyectados con IgG-PV, y respecto a la inyección con IgG-SN.

4. 4. Pretratamiento con inhibidores de los ratones

El siguiente paso fue valorar en qué medida la administración de inhibidores de las diferentes vías de señalización que deseábamos estudiar podían modular la enfermedad en los ratones.

4. 4. 1. Pretratamiento con erlotinib e inyección de fracciones de IgG-SN e IgG-PV

En primer lugar, para establecer la correlación entre el aumento de expresión de las isoformas activadas de HER y su acción en las distintas vías de señalización intracelular en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis en el PV, estudiamos el efecto del erlotinib, inhibidor de p-HER1, p-HER2 y p-HER3, tanto en las manifestaciones clínicas como histológicas de la enfermedad en los ratones, así como para determinar su efecto en la expresión de p-Src, p-Akt y p-mTOR.

4. 4. 1. 1. Inyección de IgG-SN y erlotinib

Los ratones pretratados con erlotinib e IgG-SN no presentaron la enfermedad clínica ni histológica. Tampoco se detectaron depósitos de IgG en la IFD ni en la IFI (**Tabla 8**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
E _{sn1}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
E _{sn2}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
E _{sn3}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-

Tabla 8: Hallazgos tras la administración de IgG-SN en los ratones pretratados con erlotinib.

4. 4. 1. 2. Inyección de IgG-PV y erlotinib

Los ratones pretratados con erlotinib e IgG-PV no presentaron la enfermedad clínica ni histológica (**Figura 21**). Por otro lado, se detectaron depósitos de IgG en la IFD y la IFI para IgG fue positiva (**Tabla 9**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
E _{pv1}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv2}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv3}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv4}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv5}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv6}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv7}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv8}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
E _{pv9}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+

Tabla 9: Hallazgos tras la administración de IgG-PV en los ratones pretratados con erlotinib.

Además, observamos un importante y significativo descenso en la intensidad de la expresión de las 3 isoformas de p-HER ($p < 0.05$) en la capa basal de la epidermis de los ratones pretratados con erlotinib respecto a los tratados con IgG-PV solamente (**Figuras 22**) (**Gráfica 1**). Apreciamos además una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la expresión de p-Src en la capa basal con el pretratamiento con el erlotinib (**Figura 25**) (**Gráfica 4**). Estos resultados indican que la quinasa Src podría ser activada en las células basales de la epidermis en las lesiones de PV, al menos en parte, a través de los receptores HER activados. Así mismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de p-Akt en la capa basal tras el tratamiento con erlotinib respecto a la administración solamente de IgG-PV (**Figura 24C**) (**Gráfica 3**). En cambio, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la expresión de p-mTOR tras el

pretratamiento con este inhibidor más la IgG-PV, respecto a la inyección únicamente con IgG-PV (**Figura 24**) (**Gráfico 3**).

4. 4. 2. Pretratamiento con rapamicina e inyección de fracciones de IgG-SN e IgG-PV

Con el fin de determinar cómo la p-mTOR contribuye en la patogénesis de la acantólisis en el PV y su relación con la p-Akt en las células acantolíticas de la capa basal de la epidermis, decidimos pretratar a los ratones con rapamicina y después les administramos la IgG-PV.

4. 4. 2. 1. Inyección de IgG-SN y rapamicina

Los ratones pretratados con rapamicina e IgG-SN no presentaron enfermedad clínica ni histológica. La IFD y la IFI fueron negativas para IgG (**Tabla 10**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
RP _{sn1}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
RP _{sn2}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
RP _{sn3}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-

Tabla 10: Hallazgos tras la administración de IgG-SN en los ratones pretratados con rapamicina.

4. 4. 2. 2. Inyección de IgG-PV y rapamicina

Los ratones pretratados con rapamicina e IgG-PV no presentaron la enfermedad ni clínica (**Figura 21**) ni histológicamente (**Figura 21**). Por otro lado, se detectaron depósitos de IgG en la IFD y la IFI fue también positiva (**Tabla 11**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
RP _{pv1}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv2}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv3}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv4}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv5}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv6}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv7}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv8}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
RP _{pv9}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+

Tabla 11: Hallazgos tras la administración de IgG-PV en los ratones pretratados con rapamicina.

Además, en el análisis inmunohistoquímico no observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de p-Akt en los ratones pretratados con rapamicina más IgG-PV respecto a los tratados únicamente con IgG-PV (**Figura 24**) (**Gráfica 3**).

4. 4. 3. Pretratamiento con PP1 e inyección de fracciones de IgG-SN e IgG-PV

Para determinar si además de los receptores HER otras moléculas de señalización como la Src podrían tener un papel en el PV empleamos el inhibidor PP1, un inhibidor de la Src.

4. 4. 3. 1. Inyección de IgG-SN y PP1

Los ratones pretratados con PP1 e IgG-SN no presentaron la enfermedad clínica ni histológica. Tampoco se detectaron depósitos de IgG en la IFD ni en la IFI (**Tabla 12**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
PP _{sn1}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
PP _{sn2}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
PP _{sn3}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-

Tabla 12: Hallazgos tras la administración de IgG-SN en los ratones pre-tratados con PP1.

4. 4. 3. 2. Inyección de IgG-PV y PP1

Los ratones pretratados con PP1 e IgG-PV no presentaron la enfermedad clínica (**Figura 21**) ni histológica (**Figura 21**). Por otra parte, se detectaron depósitos de IgG en la IFD y la IFI fue positiva (**Tabla 13**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	IFD	IFI
PP _{pv1}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv2}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv3}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv4}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv5}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv6}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv7}	-	Epidermis sin alteraciones	-	-
PP _{pv8}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+
PP _{pv9}	-	Epidermis sin alteraciones	+	+

Tabla 13: Hallazgos tras la administración de IgG-PV en los ratones pre-tratados con PP1.

En los estudios de inmunohistoquímica pudimos apreciar una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de p-mTOR en la capa basal de los ratones pretratados con PP1 más IgG-PV respecto a los ratones tratados con IgG-PV (**Figura 25**) (**Gráfico 3**). Por el

contrario, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de p-Akt (**Figura 25**) (**Gráfico 3**).

4. 5. Estudio de la apoptosis en el PV

4. 5. 1. Cronología de la apoptosis

Con el fin de confirmar hallazgos previos que señalaban que la apoptosis era previa a la acantólisis tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, inyectamos la IgG-PV a los ratones y los sacrificamos 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 11h y 12 horas después de dicha inyección. Mediante la técnica TUNEL pudimos comprobar que empezaban a aparecer células apoptóticas aisladas en la capa basal de la epidermis a las 8 horas de la inyección y que dichas células iban aumentando considerablemente en número en las horas siguientes (**Figura 26**). Sin embargo, la acantólisis no se hizo evidente hasta las 11 horas después de la inyección de la IgG-PV, poniendo de manifiesto que la apoptosis es un fenómeno previo a la acantólisis (**Figura 26**).

4. 5. 2. Estudio de la apoptosis con IgG-SN e IgG-PV

Mediante la realización de la técnica TUNEL a penas se observaron células apoptóticas en la capa basal de los ratones tratados con IgG-SN (**Figura 27A**). Sin embargo, cuando a los animales les administramos IgG-PV apreciamos un aumento estadísticamente significativo de dichas células ($p < 0.05$) (**Figura 27B**) (**Gráfico 5**) (**Tabla 14**).

4. 5. 3. Estudio de la apoptosis con inhibidores

4. 5. 3. 1. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y erlotinib

Mediante la cuantificación de las células apoptóticas en la capa basal de los ratones en la técnica TUNEL, pudimos comprobar un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al comparar los ratones tratados con erlotinib junto con IgG-PV respecto a los tratados con IgG-PV solamente (**Figura 27C**) (**Gráfico 5**) (**Tabla 14**).

4. 5. 3. 2. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y rapamicina

Tras realizar la técnica TUNEL y cuantificar las células apoptóticas en la capa basal observamos un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de éstas tras el pre-tratamiento de los ratones con rapamicina junto con IgG-PV, respecto a los tratados con IgG-PV solamente (**Figura 27D**) (**Gráfico 5**) (**Tabla 14**).

4. 5. 3. 3. Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y PP1

Los ratones que pretratamos con PP1 seguido de administración de IgG-PV, mostraron un descenso importante, estadísticamente significativo, en el número de células apoptóticas en la capa basal ($p < 0.05$) respecto a los ratones tratados con IgG-PV solamente (**Figura 27E**) (**Gráfico 5**) (**Tabla 14**).

4. 5. 3. 4 Estudio de la apoptosis tras la inyección de IgG-PV y inhibidor pan-caspasa

Aunque varios estudios han descrito previamente que la acantólisis puede ser inhibida mediante el pretratamiento de un inhibidor de caspasa junto con la IgG-PV, estos hallazgos únicamente han sido descritos en modelos *in vitro*. Nuestro propósito con esta experimentación fue confirmar estos hallazgos en un modelo *in vivo*.

Cuando administramos a los ratones el inhibidor pan-caspasa como pretratamiento seguido de la IgG-PV, observamos una ausencia de PV tanto clínica (**Figura 21K**) como histológicamente (**Figura 21I**). Además, mediante la cuantificación de la técnica TUNEL observamos una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del número de células apoptóticas en la capa basal tras el pre-tratamiento con inhibidor pan-caspasa seguido de IgG-PV respecto a la administración de IgG-PV solamente (**Figura 27F**) (**Gráfico 5**) (**Tabla 14**).

INHIBIDOR	IgG	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	TUNEL
-	IgG-SN	No	Epidermis sin alteraciones	-
-	IgG-PV	Si	Acantólisis suprabasal	+++
Erlotinib	IgG-PV	No	Epidermis sin alteraciones	+
Rapamicina	IgG-PV	No	Epidermis sin alteraciones	+
PP1	IgG-PV	No	Epidermis sin alteraciones	+
Inhibidor pan-caspasa	IgG-PV	No	Epidermis sin alteraciones	-

Tabla 14. Presencia de células apoptóticas en capa basal de la epidermis, después de administrar a los ratones IgG-SN e IgG-PV con y sin inhibidores.

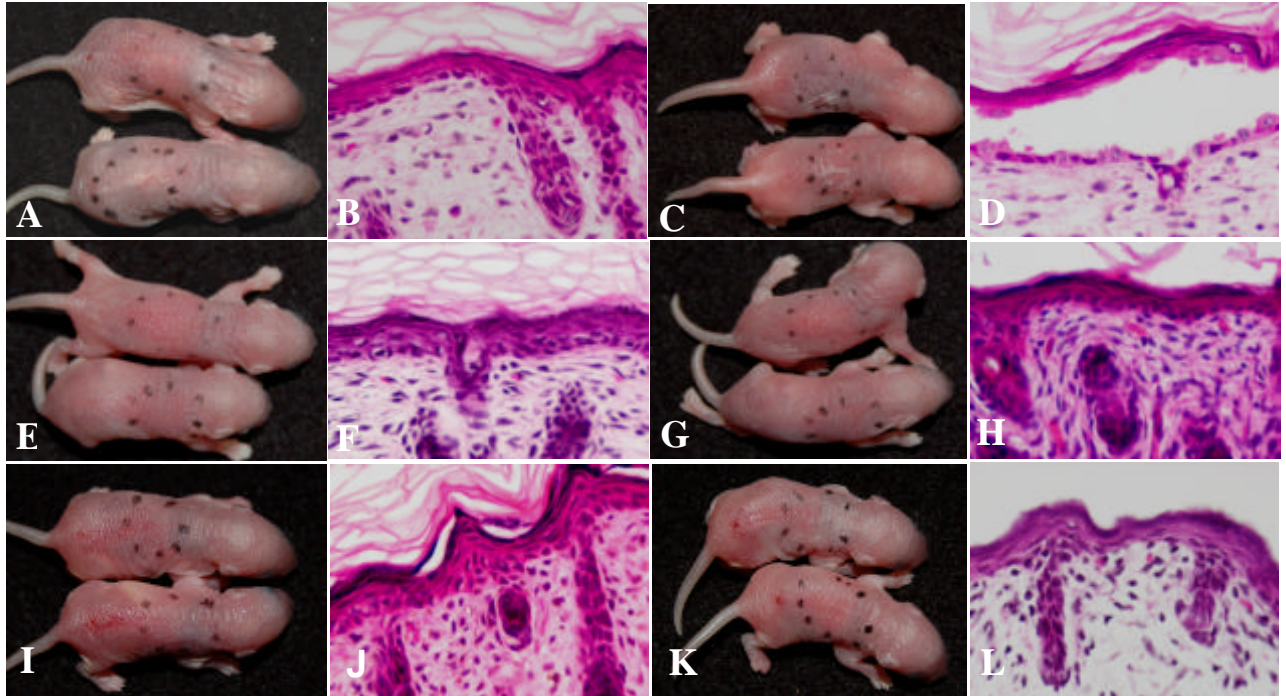


Figura 21: Hallazgos clínicos e histológicos tras la inyección de IgG-SN, IgG-PV y IgG-PV más inhibidores. No signos de enfermedad clínica (A) o histológica (B) tras la administración de IgG-SN. Signos de enfermedad clínica (signo de Nikolsky positivo) (C) e histológica (D) después de la inyección de IgG-PV. Cuando los ratones fueron pretratados con erlotinib (E,F), PP1 (G,H), rapamicina (I,J) o inhibidor pan-caspasa (K,L) antes de la inyección de IgG-PV, no se observaron manifestaciones clínicas o histológicas de la enfermedad. IgG-SN: inmunoglobulina G de paciente sano. IgG-PV: inmunoglobulina G de paciente con PV.

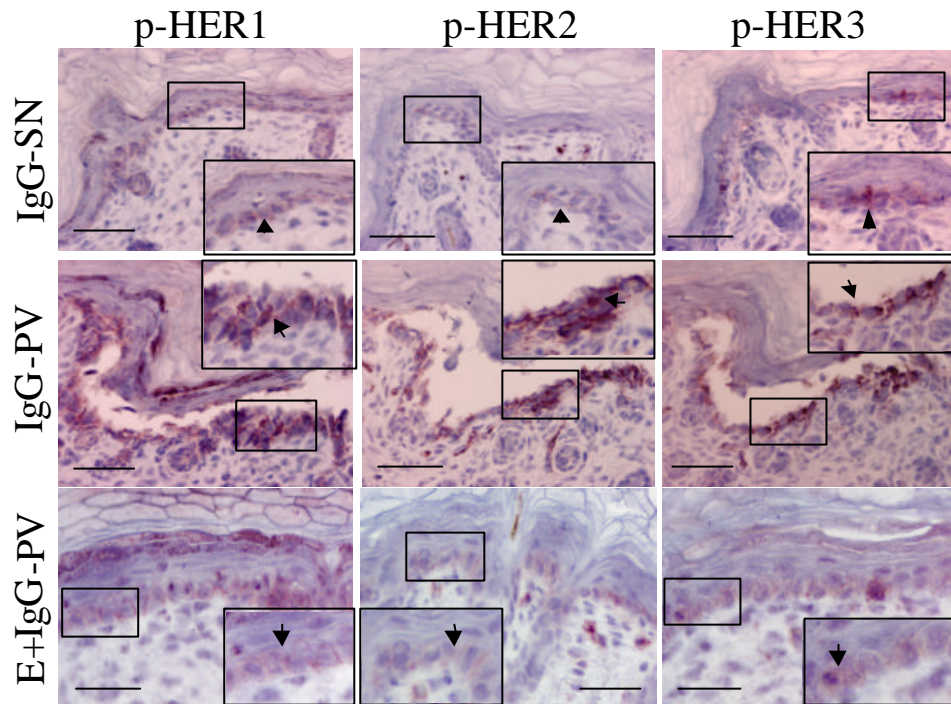


Figura 22: Hallazgos del estudio inmunohistoquímico tras la inyección de IgG-SN, IgG-PV y IgG-PV más Erlotinib. Cuando a los ratones se les administró Ig-SN el análisis inmunohistoquímico mostró una ligera expresión de p-HER1, p-HER2 y p-HER3 en la capa basal de la epidermis (flechas). Esa expresión aumentó de forma significativa después de la inyección de IgG-PV en la capa basal de la epidermis (flechas). Cuando los ratones fueron pretratados con erlotinib se observó una disminución de la expresión de p-HER1, p-HER2, p-HER3 en la capa basal de la epidermis respecto a la observada después de la administración de IgG-PV. IgG-SN: inmunoglobulina G de paciente sano; IgG-PV: inmunoglobulina G de paciente con PV; E: erlotinib.

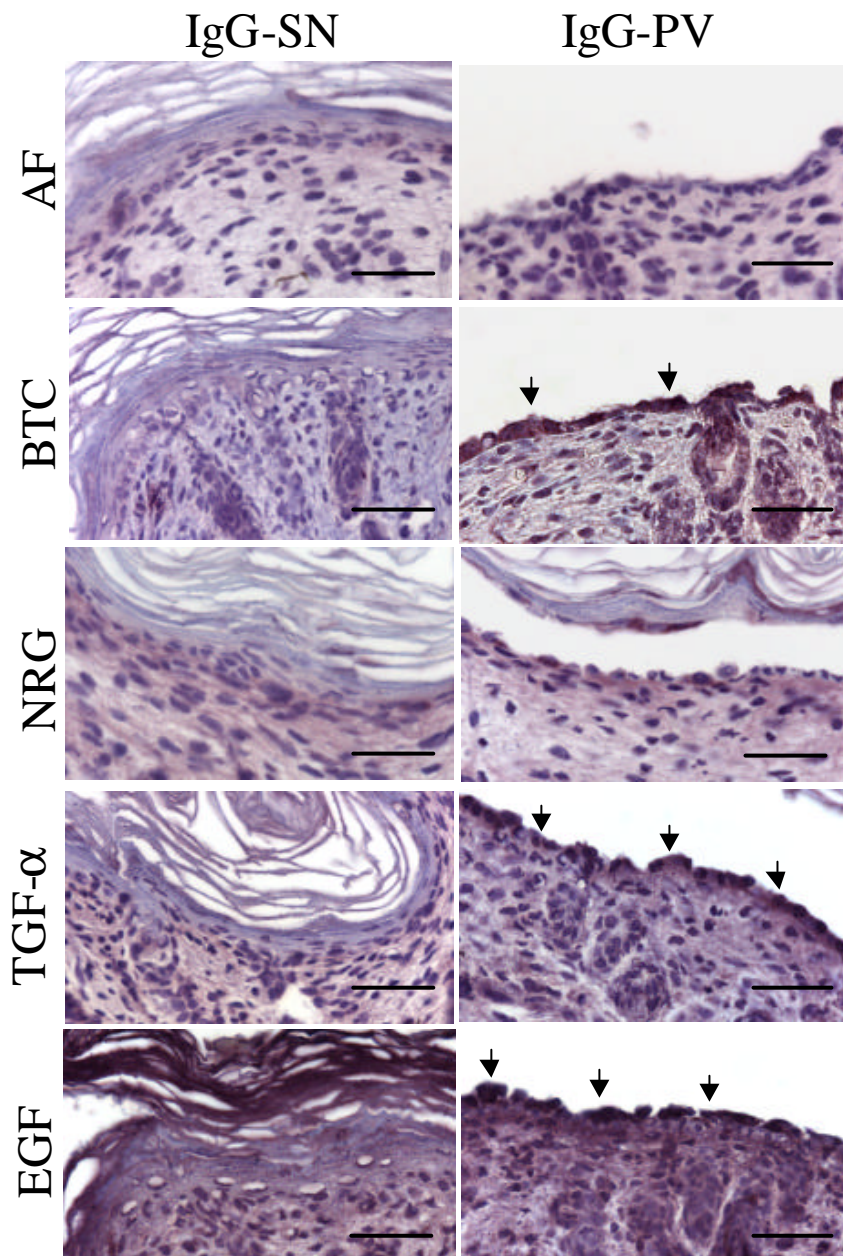


Figura 23: Hallazgos en la expresión mediante inmunohistoquímica de los ligandos de HER tras la inyección de IgG-SN y IgG-PV. Cuando a los ratones se les administró Ig-SN el análisis inmunohistoquímico mostró una ligera expresión de todos los ligandos en la capa basal de la epidermis (flechas). Sin embargo, la expresión de betacelulina, TGF- α y EGF aumentó de forma significativa después de la inyección de IgG-PV en la capa basal de la epidermis (flechas) respecto a la observada después de la administración de IgG-SN. No observamos variaciones en la expresión de neuroregulina o anfiregulina tras la administración de IgG-PV. IgG-SN: inmunoglobulina G de paciente sano; IgG-PV: inmunoglobulina G de paciente con PV; AF: anfiregulina; BTC: betacelulina; NRG: neuroregulina; TGF- α : *transforming growth factor alpha*; EGF: *epidermal growth factor*.

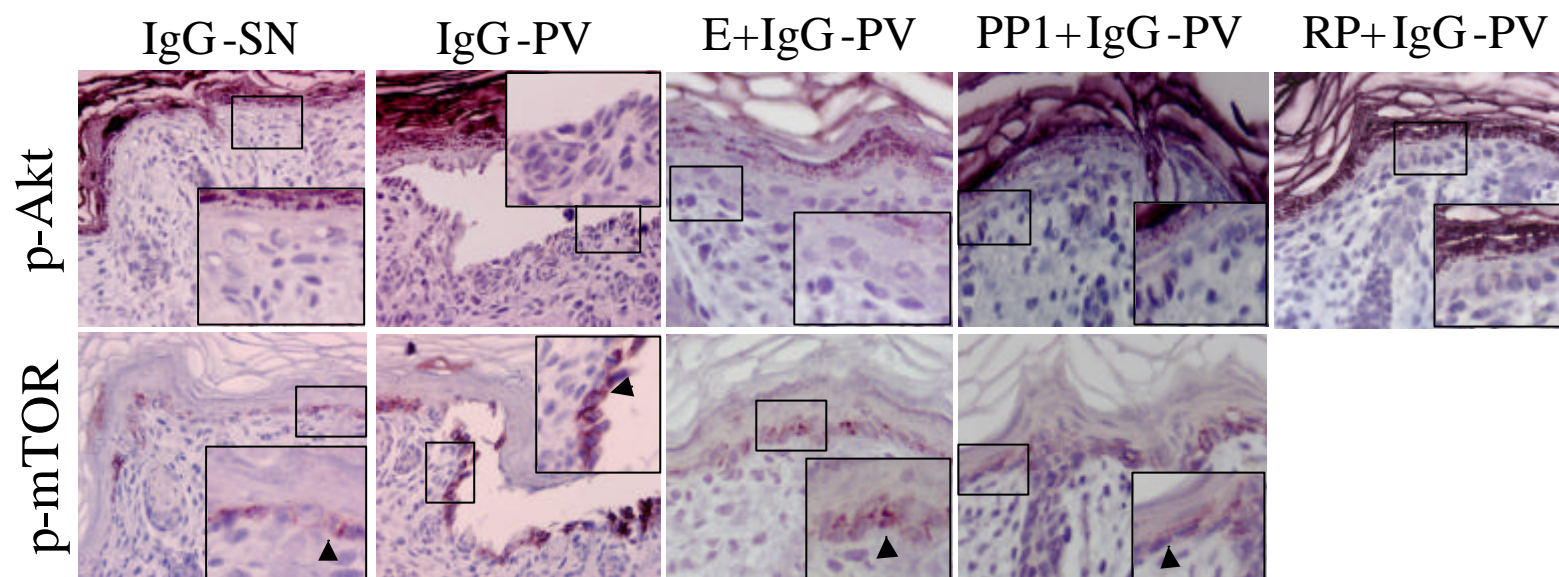


Figura 24: Hallazgos del estudio inmunohistoquímico de la expresión de p-Akt y p-mTOR tras la inyección de IgG-SN e IgG-PV. Cuando a los ratones se les administró IgG-SN el análisis inmunohistoquímico mostró una nula expresión de p-Akt en la capa basal de la epidermis. La expresión de p-mTOR fue dispersa y de intensidad media en la capa basal. La expresión de p-Akt no varió en la capa basal tras la administración de IgG-PV, mientras que la expresión de p-mTOR aumentó de forma significativa en la capa basal (flechas). Cuando los ratones fueron pretratados con erlotinib e IgG-PV, observamos una menor expresión de P-mTOR y ningún cambio en la expresión de p-Akt. Cuando los ratones fueron pretratados con rapamicina e IgG-PV, no observamos cambios en la expresión de p-Akt. Por último, cuando los ratones fueron pretratados con PP1 e IgG-PV, observamos una menor expresión de p-mTOR y ningún cambio en la expresión de p-Akt respecto a la inyección de IgG-PV solamente. IgG-SN: inmunoglobulina G de paciente sano. IgG-PV: inmunoglobulina G de paciente con PV. E: erlotinib; RP: rapamicina.

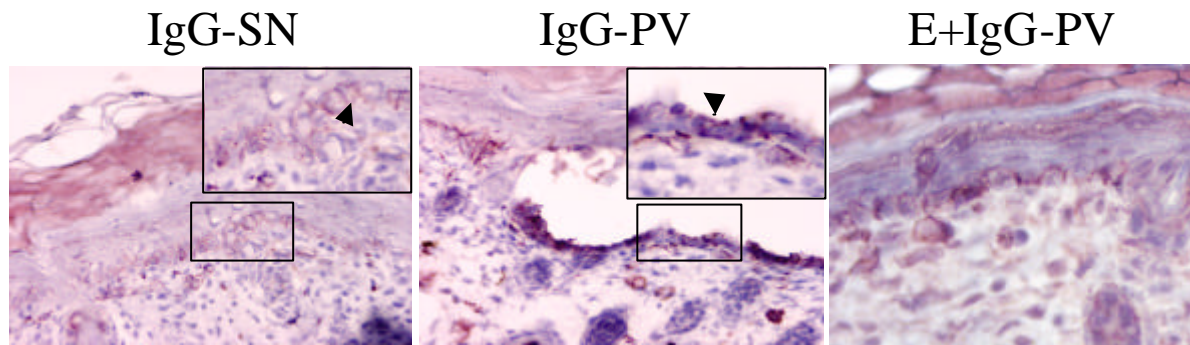


Figura 25: Hallazgos del estudio inmunohistoquímico de la expresión de p-Src tras la inyección de IgG-SN, IgG-PV y erlotinib junto con IgG-PV. La administración de IgG-SN a los ratones mostró una ligera expresión de p-Src en la capa basal de la epidermis. Tras la inyección de IgG-PV la expresión de p-Src aumentó de forma significativa en la capa basal de la epidermis. Cuando los ratones fueron pretratados con erlotinib esta expresión disminuyó significativamente. IgG-SN: inmunoglobulina G de paciente sano; IgG-PV: inmunoglobulina G de paciente con PV; E: erlotinib.

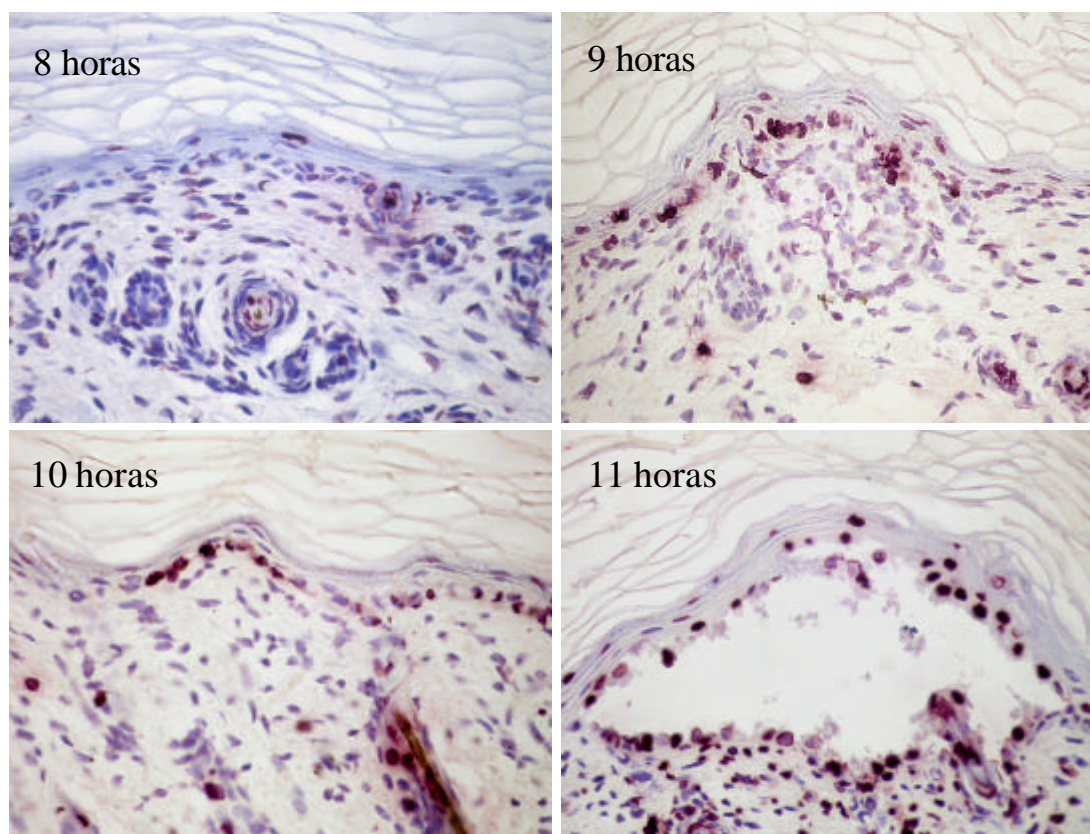


Figura 26: Estudio de los procesos de apoptosis y acantolisis en el modelo murino de PV. Estudio de la cronología de la apoptosis después de la administración de IgG-PV mediante la técnica TUNEL. Después de 8 horas tras la administración de IgG-PV a los ratones se empezaron a observar células apoptóticas en la capa basal de la epidermis, fundamentalmente alrededor de los folículos pilosos. A las 9 y 10 horas de la inyección de IgG-PV, se apreciaron células apoptóticas en casi toda la extensión de la capa basal de la epidermis. Al cabo de 11 horas de la administración de IgG-Pv, se observó acantolisis suprabasal junto con apoptosis en la capa basal y capas epidérmicas superiores.

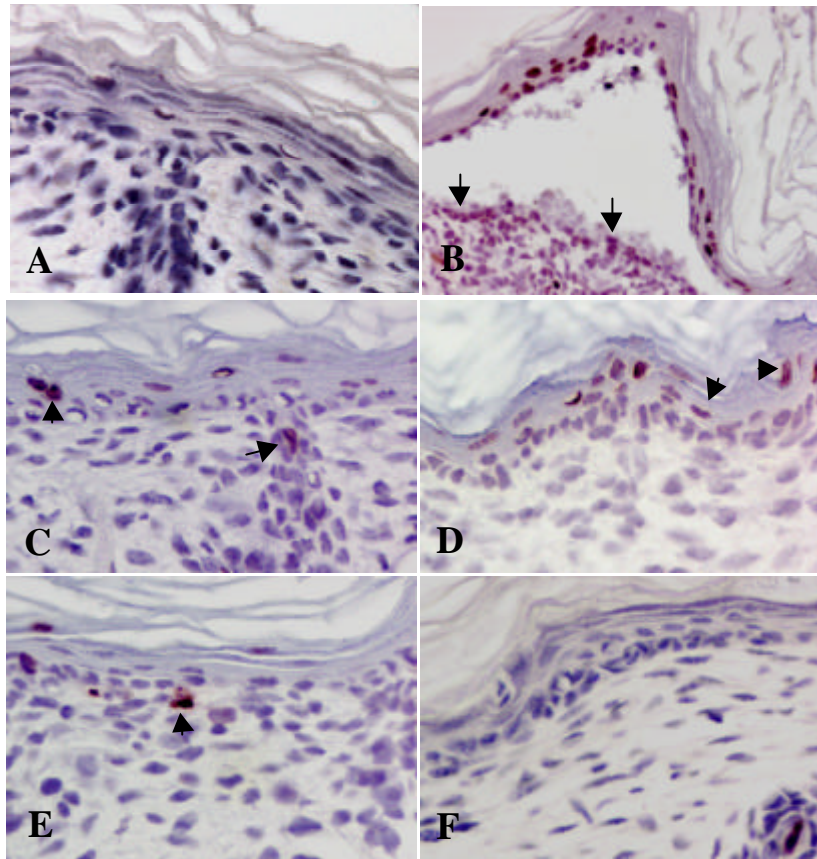
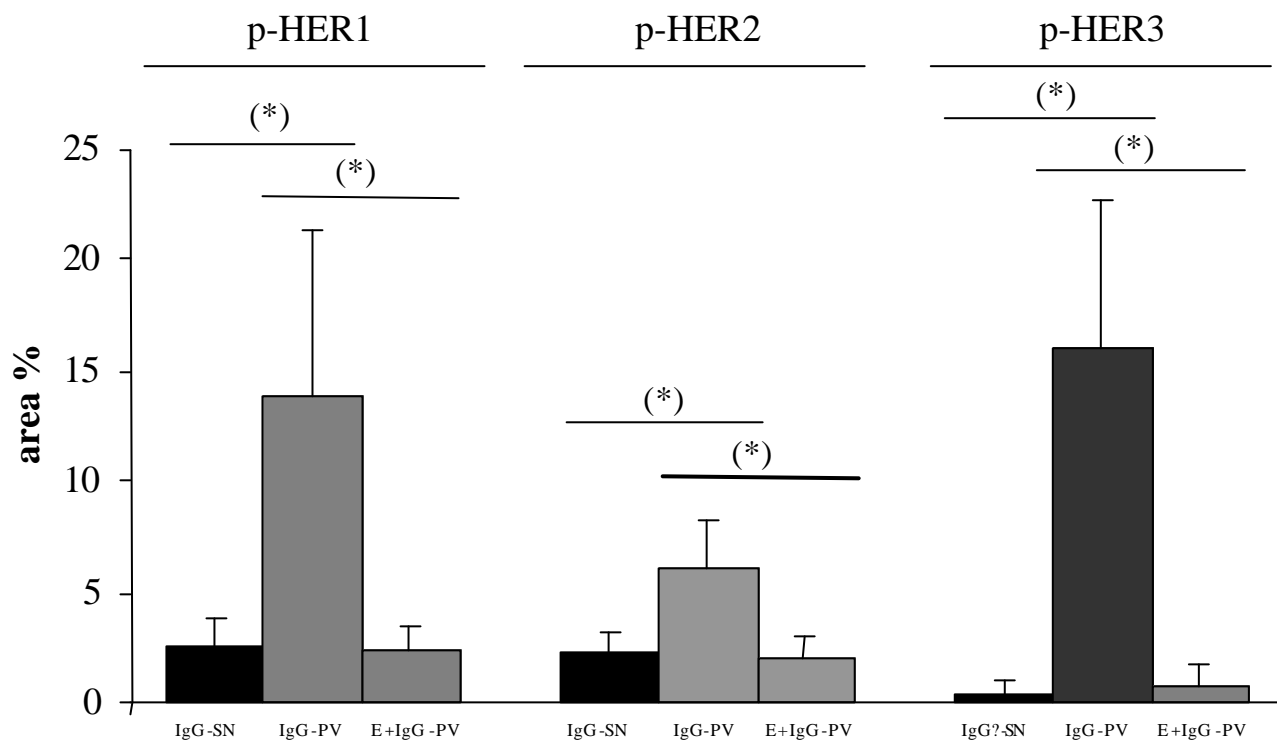
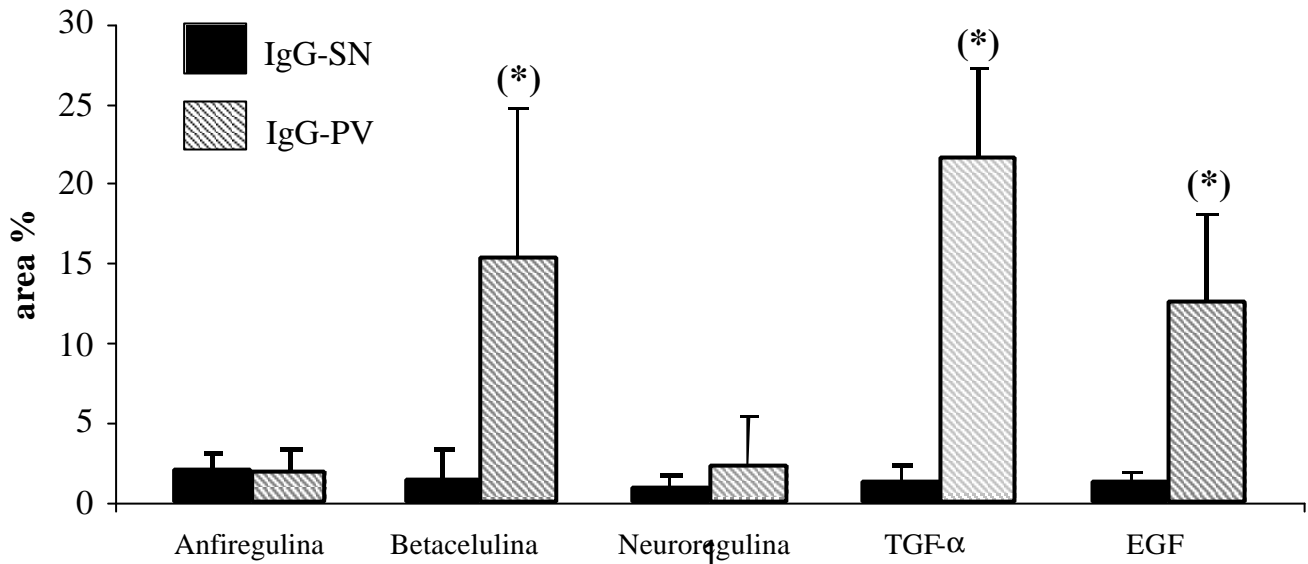


Figura 27: Estudio de la apoptosis en el modelo murino de PV con distintos inhibidores mediante la técnica TUNEL. A) Doce horas después de la inyección de IgG-SN no se observaron células apoptóticas. B) Tras la administración de IgG-PV a los ratones observamos un aumento de las células TUNEL positivas en la capa basal. Tras el pretratamiento con los inhibidores erlotinib (C), rapamicina (D), PP1 (E) e inhibidor pan-caspasa (F) observamos una disminución casi completa de las células TUNEL positivas en la capa basal. IgG-SN: inmunoglobulina G de paciente sano. IgG-PV: inmunoglobulina G de paciente con PV.



Gráfica 1: Cuantificación del análisis inmunohistoquímico de la expresión de las formas activadas de HER. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de p-HER1, p-HER2 y p-HER-3 en la capa basal de la epidermis después de la inyección de IgG-PV respecto a la administración de IgG-SN. Después del pretratamiento de los ratones con erlotinib, apreciamos un descenso estadísticamente significativo en la capa basal de las tres isoformas de HER activadas respecto a la inyección de IgG-PV solamente. Los datos se muestran como \pm desviación estándar (DE); * $p < 0.05$. IgG-SN: IgG de paciente sano; IgG-PV: IgG de paciente con PV; E: erlotinib.



Gráfica 2: Cuantificación del análisis inmunohistoquímico de la expresión de los ligandos de HER. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de BTC, TGF- α y EGF en la capa basal de la epidermis después de la inyección de IgG-PV respecto a la administración de IgG-SN. No apreciamos cambios en la expresión de AF o NRG. Los datos se muestran como \pm desviación estándar (DE); * $p < 0.05$. IgG-SN: IgG de suero control; IgG-PV: IgG de paciente con PV. AR: anfiringulina; BTC: betacelulina; NRG: neuroregulina; TGF- α : *transforming growth factor- α* ; EGF: *epidermal growth factor*.

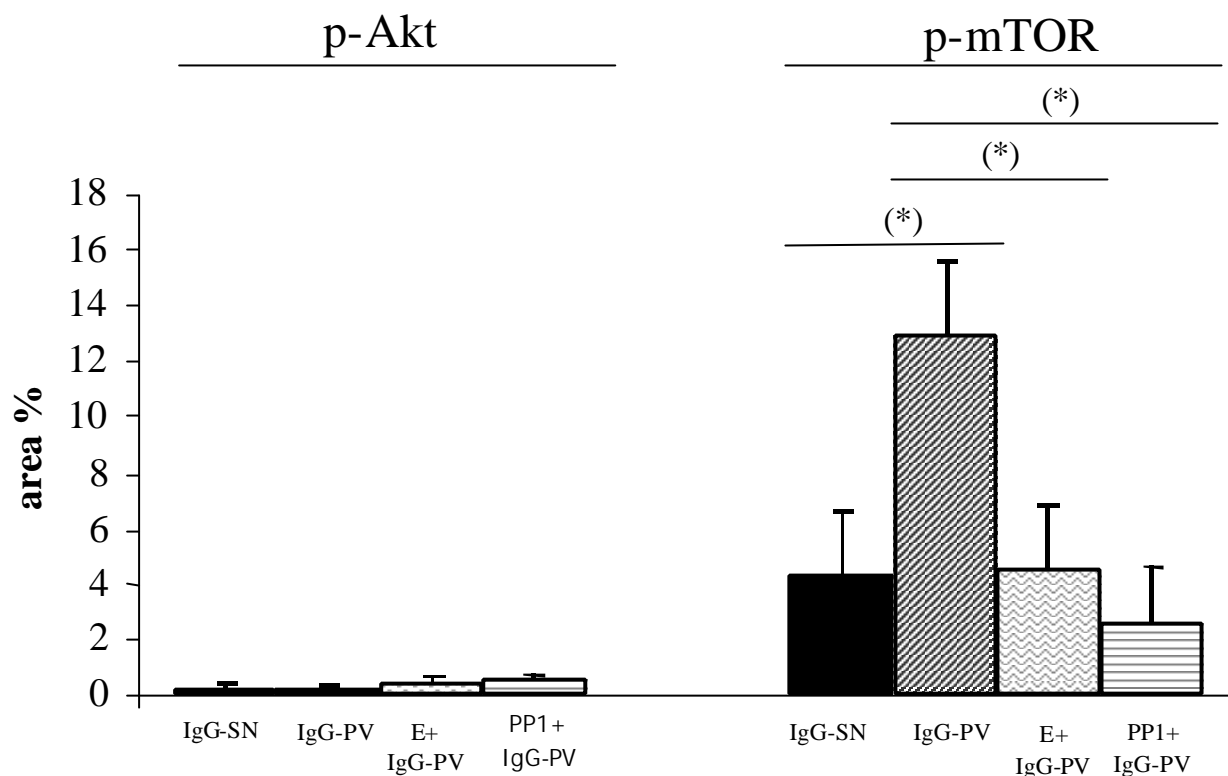
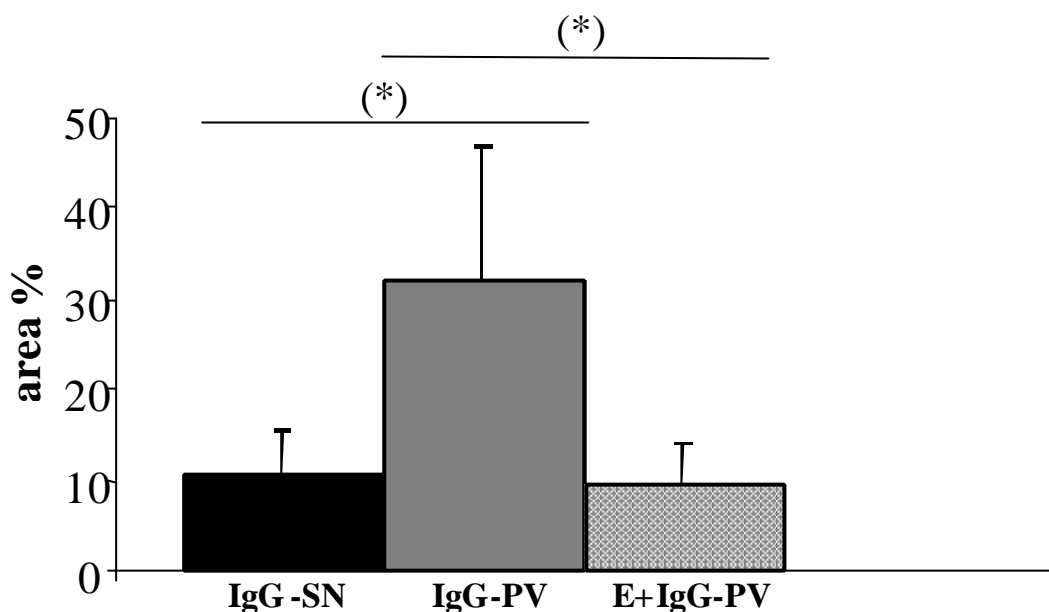
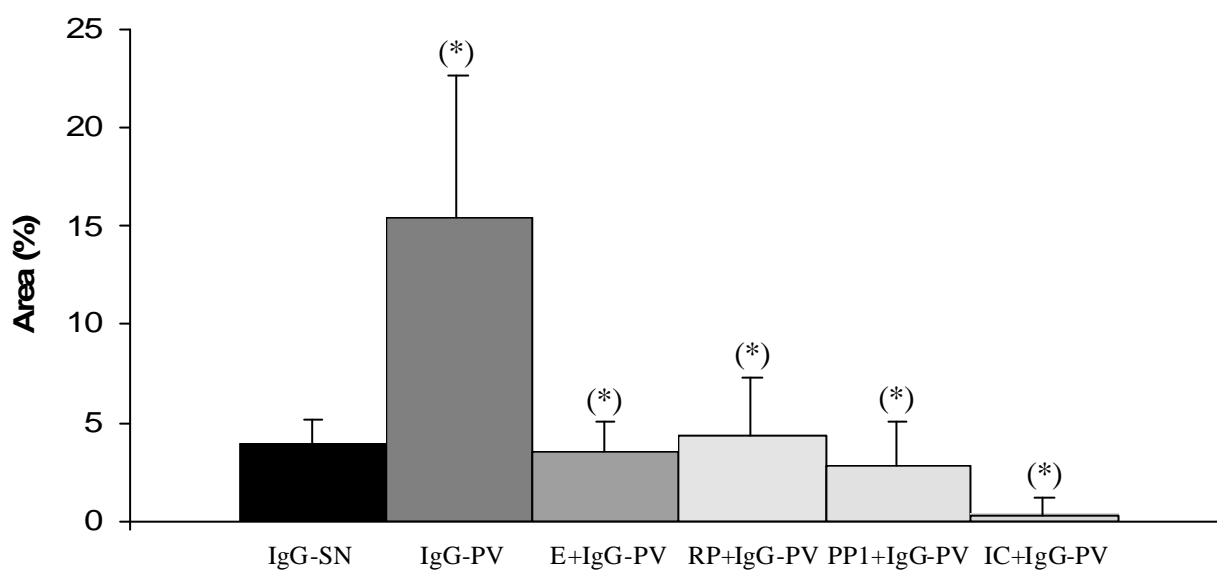


Gráfico 3. Cuantificación del análisis inmunohistoquímico de la expresión de las formas activadas de Akt y mTOR. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de p-mTOR en la capa basal de la epidermis después de la inyección de IgG-PV respecto a la administración de IgG-SN, no apreciándose cambios significativos, en cambio, en la expresión de p-Akt. Después del pretratamiento de los ratones con erlotinib y PP1 apreciamos un descenso estadísticamente significativo en la capa basal de la expresión de p-mTOR respecto a la inyección de IgG-PV solamente. Por último, no observamos cambios estadísticamente significativos en la expresión de p-Akt tras el pretratamiento de los ratones con erlotinib, rapamicina o PP1, respecto a la inyección con IgG-SN. Los datos se muestran como \pm DE; * $p < 0.05$. IgG-SN: IgG de paciente sano; IgG-PV: IgG de paciente con PV; E: erlotinib.



Gráfica 4: Cuantificación del análisis inmunohistoquímico de la expresión de las formas activadas de Src. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de p-Src en la capa basal de la epidermis de los ratones después de la inyección de IgG-PV respecto a la administración de IgG-SN. Después del pretratamiento de los ratones con erlotinib apreciamos un descenso estadísticamente significativo de la expresión de p-Src. Los datos se muestran como \pm DE; * $p < 0.05$. IgG-SN: IgG de suero control; IgG-PV: IgG de paciente con PV. E: erlotinib.



Gráfica 5: Cuantificación de las células apoptóticas en la capa basal mediante la técnica TUNEL Doce horas después de la inyección de IgG-PV se observó un aumento estadísticamente significativo de las células TUNEL positivas en la capa basal respecto a la administración de IgG-SN. Después del pretratamiento de los ratones con erlotinib, rapamicina, PP1 y pan-caspasa apreciamos un descenso estadísticamente significativo de las células apoptóticas, respecto a la administración de IgG-PV solamente. Los datos se muestran como \pm DE; * $p < 0.05$. IgG-SN: IgG de suero control; IgG-PV: IgG de paciente con PV. E: erlotinib; RP: rapamicina; PP1: inhibidor de Src PP1; IC: inhibidor pan-caspasa.

5.DISCUSIÓN

Hoy en día el mecanismo molecular por el cual se produce la acantólisis en el PV no es conocido totalmente. No obstante, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que muestran la complejidad del proceso de separación intercelular de los queratinocitos que se produce en las lesiones de PV. Muchos hallazgos confirman que aunque el resultado final en esta enfermedad es una rotura de los desmosomas de los queratinocitos exactamente por encima de la capa basal de la epidermis, previamente se ponen en marcha múltiples vías de señalización intracelulares de gran relevancia patogénica.

Nuestro grupo de trabajo de investigación en el PV está constituido por los Departamentos de Dermatología, Bioquímica, Inmunología, Otorrinolaringología y Oftalmología. En los últimos años nuestros objetivos han sido intentar clarificar aquellos mecanismos que operan en esta enfermedad ampollosa, abordándolo de una forma multidisciplinar, y con un componente importante de investigación traslacional. En el presente trabajo, y como continuación de estudios anteriores, nuestro objetivo ha sido conocer nuevos mecanismos implicados en la patogénesis del PV. Basándonos en hallazgos usando un modelo murino de PV de transferencia pasiva (Sanchez-Carpintero et al, 2004; Marquina et al, 2008), así como en resultados obtenidos con células en cultivo (Pelacho et al. 2004), hemos intentado determinar en qué medida están implicadas distintas moléculas de señalización intracelular en la inducción y desarrollo de la acantólisis (ErbB, Akt, mTOR, Src) así como en la apoptosis y en la patogénesis de esta enfermedad. A su vez, hemos investigado el efecto sobre la enfermedad de distintos inhibidores de estas moléculas, lo que podría suponer un gran avance en la terapéutica de estos enfermos en un futuro próximo.

6. 1. Experimentos de transferencia pasiva en un modelo murino

Desde hace más de veinte años, el modelo *in vivo* murino se viene utilizando con gran utilidad como herramienta para el estudio de los mecanismos que operan en el PV (Anhalt et al, 1982). Este hecho es debido a la semejanza que existe entre las proteínas humanas y murinas que constituyen los desmosomas, y en concreto entre las desmogleínas. Este hecho ha permitido reproducir la enfermedad en ratones recién nacidos administrando de forma pasiva IgG purificada de pacientes con PV en fase activa. Además, se ha podido demostrar que la transferencia de IgG purificada de pacientes afectados de PV, reproduce fielmente la enfermedad en los ratones, tanto desde el punto de vista clínico, como inmunológico e histopatológico (Takahashi et al. 1985). Este hecho, por tanto, nos da la oportunidad de realizar diferentes estudios para determinar la patogénesis de la enfermedad, permitiendo

después extrapolar los resultados a la especie humana. Otro hecho importante es que los modelos *in vivo* se adecuan más a la realidad que los modelos *in vitro*, ya que en los primeros existe una interacción de múltiples factores que no se pueden establecer *in vitro*. Por todo ello, en el presente trabajo hemos continuado utilizando un modelo *in vivo* murino, al igual que en nuestros estudios anteriores.

Hemos preferido también emplear ratones C57 recién nacidos de pocas horas, en lugar de utilizar animales adultos. El peso de todos ellos ha estado comprendido entre 1.5 y 1.9 gramos. De esta forma hemos podido utilizar dosis muy bajas de IgG purificada debido el bajo peso del animal y realizar una mejor evaluación clínica de la enfermedad al carecer los animales de pelo.

A la hora de utilizar los sueros de pacientes con PV, decidimos emplear solamente aquellos de pacientes con PV cutáneo-mucoso. Esta decisión está fundamentada en la observación de que únicamente la IgG-PV procedente de pacientes con afectación de piel y mucosas puede producir enfermedad en los ratones. Por el contrario, las IgG procedentes de pacientes con afectación únicamente de mucosas, o con enfermedad cutánea en una extensión pequeña, no reproducen la enfermedad en el ratón. Es por este motivo por el que utilizamos en nuestro modelo IgG procedente de pacientes que no solamente cumplían los criterios de PV (Amagai et al, 1994; Sanchez-Carpintero et al, 2004; Marquina et al, 2008), sino que además tenían afectación cutánea extensa, y que en sangre periférica presentaban anticuerpos circulantes a título elevado frente a Dsg1 y Dsg3 (Ding et al, 1997). Además, realizamos los estudios por triplicado para poder confirmar nuestros resultados y analizarlos estadísticamente. Finalmente, la caracterización de cada uno de los sueros utilizados mediante *immunoblotting* presentó las típicas bandas frente a Dsg1 y Dsg3. Todos estos hallazgos confirman que los sueros empleados eran adecuados para realizar el estudio que deseábamos llevar a cabo.

Mediante estudios de inmunohistoquímica, se ha puesto de manifiesto la presencia de Dsg1 en todo el espesor de la epidermis del ratón, aunque de forma más importante en las capas más superficiales. Por el contrario, la Dsg3 se expresa de forma exclusiva en las células de la capa basal y suprabasal de la epidermis (Mahoney et al, 1999). Estos hallazgos son superponibles a los encontrados en la piel del ser humano adulto (Amagai et al, 1996). Esta distribución casi idéntica de ambas desmogleínas en las dos especies es un argumento más para utilizar de forma fiable el modelo animal murino en el estudio del PV, y poder extrapolar sus resultados a paciente afecto de esta enfermedad.

La administración de las fracciones de IgG procedentes de los pacientes con PV o de donante sano, y de los distintos inhibidores la realizamos por vía intradérmica en todos los casos. Esta vía de administración tiene varias ventajas para nuestro modelo de experimentación. En primer lugar, la dosis de IgG necesaria para reproducir la enfermedad en los ratones es menor que por vía intraperitoneal, economizando la cantidad de IgG purificada necesaria y de los distintos inhibidores. En segundo lugar, los inhibidores que queríamos administrar eran más manejables mediante administración local que por vía intradérmica, evitando en los ratones los efectos adversos sistémicos derivados de su administración peritoneal. Sin embargo, la vía de administración intradérmica tiene algunos inconvenientes. Requiere cierta pericia en su administración ya que es complicado inyectar la IgG y los inhibidores en la piel de los ratones de un tamaño tan pequeño, sin dañar letalmente al animal. Además, es más difícil determinar exactamente la zona de actuación de estos compuestos así como la dosis necesaria de cada uno de ellos debido a la posibilidad de difusión por los tejidos, de su absorción sistémica o incluso por la pérdida parcial de cierto volumen de los compuestos a través del orificio de punción. Este hecho lo hemos solventado en nuestro modelo marcando con precisión en el ratón el lugar de cada una de las inyecciones. Aunque la primera vez que se logró reproducir la enfermedad en este modelo la administración de IgG-PV purificada se realizó por vía intraperitoneal (Anhalt et al, 1982), la tendencia actual es emplear la vía intradérmica (Ding et al, 1999).

A la hora de la elección de los distintos inhibidores, nos basamos en sus características inhibitorias frente a las moléculas que participan en las vías de señalización intracelular que queríamos estudiar, y en su selectividad en otros modelos experimentales. Los inhibidores que hemos utilizado en nuestro estudio (el inhibidor de EGFR erlotinib (Pollack et al. 1999), el inhibidor de mTOR rapamicina (Teachey et al, 2006), el inhibidor de Src PP1 (Jadhav et al, 2007) y el inhibidor pan-caspasa (Imao et al, 2006)) han sido previamente usados con éxito en modelos *in vivo* para explorar la implicación de estas moléculas de señalización intracelular en varias enfermedades inflamatorias, aunque ninguno por vía intradérmica sino por vía intraperitoneal. Ninguno de los inhibidores que hemos usado ha sido previamente utilizado en el estudio del PV en un modelo murino. A su vez, la administración de cada uno de estos inhibidores se realizó 2 horas antes de la inyección de cada fracción de IgG, basándonos en nuestra experiencia previa con este mismo modelo (Sánchez-Carpintero et al, 2004; Marquina et al, 2008), así como en los tiempos empleados en estudios *in vivo* en animales (Pollack VA et al, 1999; Teachey et al, 2006; Jadhav et al, 2007; Imao et al, 2006).

Para la elección de la dosis de estos inhibidores nos basamos también en estos estudios. En ningún caso hemos tenido problemas de toxicidad con las dosis de inhibidores empleadas, ni el fallecimiento de los animales por sobrecarga de volumen en los casos que inyectamos IgG e inhibidores (se inyectaron siempre volúmenes inferiores a 100 μ l por cada inyección). El hecho de incluir en este estudio fármacos inhibidores que además han sido empleados en pacientes para el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias, realza aún más nuestros resultados al poder dirigir estos tratamientos potencialmente a pacientes con PV.

La valoración clínica de la enfermedad se determinó a las 12 horas de la administración de la IgG purificada, procedente tanto de pacientes con PV como de donante sano. Mediante el estudio cronológico de la acantólisis hemos determinado que ésta se produce a las 11 horas tras la inyección de la IgG-PV, por lo que decidimos esperar una hora más y realizar nuestros estudios a las 12 horas. En aquellos casos en que tratamos a los ratones previamente con alguno de los inhibidores, se realizó la valoración a las 14 horas de administrar el inhibidor correspondiente.

Los estudios de inmunofluorescencia realizados en las muestras de sangre periférica (IFI) y de tejido perilesional (IFD) obtenidas de todos los ratones usados en nuestra experimentación han confirmado que los sueros SN no contenían IgG-PV (IFI e IFD negativas en todos los casos) y que los sueros de pacientes con PV contenían IgG-PV (IFI e IFD positivas en todos los casos). La positividad de la IFI demuestra el paso de IgG-PV al sistema circulatorio de los ratones, mientras que la positividad de la IFD en los dos tercios inferiores de la epidermis de los ratones muestra que la IgG-PV se une a la superficie de los queratinocitos. Asimismo, en la epidermis de los ratones a los que previamente se les administró un inhibidor, la IFD fue también positiva en los dos tercios inferiores de la epidermis, confirmando así que los inhibidores no han impedido la unión de la IgG-PV a los queratinocitos en ninguno de los casos. Analizando todos estos datos, se demuestra que el modelo animal murino es útil para el estudio del PV, ya que no solamente se consigue que la IgG humana administrada se una a la piel del ratón y produzca la enfermedad, sino que también no se artefacte este efecto deseado con la administración de fármacos en el modelo experimental.

7. 2. Hallazgos de los experimentos

Numerosos avances realizados en los últimos años nos han aportado claves importantes para comprender mejor esta apasionante enfermedad. Sin embargo, sigue siendo todavía un

enigma porqué en los pacientes con PV se desarrolla únicamente la separación (acantólisis) de la epidermis a nivel suprabasal, a pesar de observar depósitos pericelulares de IgG en los 2/3 inferiores de la epidermis mediante IFD. O dicho de otra manera, qué mecanismos adicionales se producen en el PV para que además de unirse la IgG a la membrana de los queratinocitos de la epidermis en varios estratos, se produzca únicamente la acantólisis de forma selectiva entre la capa basal y la zona suprabasal. Además, este es un hallazgo constante y característico de todos los pacientes con PV: podrán presentarse más o menos lesiones clínicamente, tener lesiones solo en las mucosas o además presentar lesiones en la superficie cutánea, pero en todos los casos de PV se observará histológicamente acantólisis suprabasal.

Hasta hace poco tiempo se había pensado que la localización de la acantólisis a nivel suprabasal en el PV podría estar determinada por la distribución de las Dsg1 y 3 en los queratinocitos epidérmicos (teoría compensatoria) (Mahoney et al, 1999). No obstante, la ausencia de lesiones espontáneas en ratones *knock-out* para la Dsg3 (Koch et al, 1997) o la ausencia de lesiones de ampollas subcorneales en los pacientes que coexpresan anticuerpos anti-Dsg1 y anti-Dsg3 demuestran que debe haber algún otro factor adicional para que la rotura de la epidermis se produzca de forma tan característica y constante. Asimismo, varios trabajos han mostrado la existencia de varios antígenos diferentes a las Dsg (receptores de acetil-colina (Nguyen et al, 2000), desmocolinas (Dmochowski et al, 1993), etc) frente a los que se dirigen los anticuerpos de los pacientes con PV. En este sentido, recientemente se ha demostrado que anticuerpos frente a antígenos no-desmogleínicos pueden tener también un papel relevante en la acantólisis suprabasal final en el PV (Chernyavsky et al, 2007). Así pues, considerados todos estos hallazgos, se puede concluir que la teoría compensatoria, hoy por hoy, no explica satisfactoriamente la selectividad de la acantólisis suprabasal observada en las lesiones de PV.

Se han propuesto otras teorías patogénicas, en un intento de explicar cómo podrían actuar los autoanticuerpos IgG-PV al unirse a sus antígenos localizados en la membrana de los queratinocitos. Entre estos mecanismos, destaca la disrupción física de la adhesión de las Dsg por bloqueo de la superficie de unión, debido a la acción directa de los autoanticuerpos (*Steric Hindrance Theory*) (Shimizu et al, 2004). Recientemente, Yokouchi et al han propuesto que al menos una parte de todos los anticuerpos circulantes que presenta un paciente con PV sería la responsable de esta pérdida de adhesión de las Dsg entre sí, por una acción directa de la IgG-PV en sitios de interacción trans entre las Dsg (Yokouchi et al,

2009). A su vez, la separación celular se podría llevar a cabo por la deplección de Dsg de la membrana con formación de desmosomas aberrantes y débiles que provocan la separación intercelular (Calkins et al, 2006); o por la activación de vías de señalización intracelular que provocarían en última instancia la disfunción de las Dsg (Kitayima et al, 1999; Seishima et al, 1995; Esaki et al, 1995; Osada et al, 1997); o también a través la separación de los queratinocitos secundaria a la retracción del citoesqueleto (*Basal Cell Shrinkage Hypothesis*) (Bystryn et al, 2003); y también mediante la apoptosis inducida por la unión de los autoanticuerpos (Arredondo et al, 2005; Pelacho et al, 2004; Puviani et al, 2003; Wang et al, 2004). Otra hipótesis ha postulado que en la acantólisis del PV cada antígeno diana activaría una vía específica de señalización intracelular que se complementaría y actuaría de forma sinérgica con las demás para producir pérdida de la adhesión y formación de lesiones ampollosas (*Multiple Hit Theory*) (Grando et al, 2006). De esta forma, aunque se inhiba solo alguna de estas vías, se podría inhibir la acantólisis finalmente. Si bien esta teoría no aporta ningún hallazgo nuevo, sí que al menos puede contribuir a entender mejor el mecanismo de acantólisis del PV como una unidad, en la que actuarían varios procesos coordinados, interrelacionados entre sí, a través de la activación de varias vías de señalización intracelular, y debiendo de actuar todas ellas juntas para que la separación intercelular se produzca. Si esta teoría fuera cierta, podríamos actuar farmacológicamente sobre una de las vías consideradas fundamentales en la producción de la acantólisis, para así controlar la enfermedad. Esta teoría es la más aceptada hoy en día a la hora de explicar lo que ocurre en el PV.

A pesar de todo –y como comentábamos anteriormente–, hasta ahora no existen hallazgos que clarifiquen el mecanismo por el cual se produce selectivamente la acantólisis a nivel suprabasal en la epidermis en la piel de los pacientes con PV. Recientemente (Bystryn et al, 2006) ha sugerido que las características estructurales distintas de los queratinocitos de la capa basal y de aquellos localizados en la región suprabasales, junto a la expresión de receptores de membrana específicos en la capa basal, y la presencia de vías de señalización específicas en las células basales, explicarían la selectividad de la acantólisis a nivel suprabasal en el PV. En concreto, la presencia de citoqueratinas basales (K5 y K14) darían más rigidez a las células y permitiría una condensación de estos filamentos alrededor del núcleo solamente en este estrato celular; o la expresión de receptores muscarínicos M3 basales para acetil-colina explicaría porqué los anticuerpos IgG-PV desencadenan una respuesta intracelular solamente en la capa basal; y además, se sumaría también la activación

de vías de señalización específicas, también en la capa basal, que conllevarían fenómenos de fosforilación de proteínas (Seishima et al, 1997; Seishima et al, 1999; Aoyama et al, 1999; Nguyen et al, 2004; Nguyen et al, 2004; Sánchez-Carpintero et al, 2004; Berkowitz et al, 2005). De esta manera, no sería la diferencia en la expresión de las Dsg1 y 3 en la epidermis (teoría compensatoria) lo que fundamentaría el tipo de acantólisis en el PV, sino las particularidades moleculares de las células de la capa basal (Bystryn et al, 2006). Nuestros hallazgos en el presente trabajo están de acuerdo con esta afirmación, y muestran que la restricción de la acantólisis a la región suprabasal no es solo debida a las diferencias morfológicas entre las células basales y suprabasales. Nosotros aportamos la evidencia de que la apoptosis y la acantólisis ocurren de forma coordinada como consecuencia de las diferencias moleculares entre las células basales y suprabasales, así como por los cambios moleculares creados en la capa basal de la epidermis después de la unión de la IgG-PV a las células. Además, demostramos que dentro de las vías de señalización activadas en la capa basal de la epidermis después de la unión de los autoanticuerpos IgG-PV a sus antígenos, tiene una relevancia capital los receptores de la familia HER y de ciertas quinasas como la Src y la mTOR.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la HER1 se expresa fundamentalmente en las células de la capa basal de la epidermis (Green et al, 1983; Holbro et al, 2005). La HER2 se expresa normalmente en las células basales de la epidermis y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Kiguchi et al, 2000). La HER3 se expresa en todas las capas de la epidermis humana y murina, aunque su expresión es mayor en la capa suprabasal (De Potter et al, 2001). Por último, la HER4 no suele expresarse en la epidermis.

Varios estudios, en los que se han empleado cultivos celulares de queratinocitos han aportado evidencias del importante papel del EGFR (HER1) en el ensamblaje y desensamblaje de los desmosomas y las uniones adherentes (Gaudry et al, 2001; Lorch et al, 2004; Yin et al, 2005). Posteriormente, ha sido descrito en un modelo *in vitro* que el EGFR (HER1) se activa tras la unión de IgG-PV a los antígenos de las células basales (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007). A su vez, la administración de inhibidores de HER1 pudo prevenir la acantólisis cuando se administró junto a IgG-PV (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007). Estos hallazgos han demostrado que, al menos *in vitro*, la HER1 podría tener un papel relevante en la acantólisis del PV.

En nuestro trabajo, después de la administración de IgG-PV a los ratones, hemos observado un aumento significativo de la expresión de P-HER1, P-HER2 y P-HER3 en la capa basal de

la epidermis respecto a la observada tras la administración de la IgG-SN. Fue interesante observar que tras el pre-tratamiento de los ratones con el inhibidor erlotinib (inhibidor de HER1, HER2 y HER3), se anuló la acantólisis clínica e histológicamente en los ratones. Nuestros hallazgos muestran varios puntos importantes no descritos previamente. Por una parte, muestran que en la acantólisis del PV tiene un papel relevante no solamente la HER1, sino también otras isoformas de la familia HER. Además, confirma también que esta familia de receptores interviene de forma activa también en PV en un modelo murino. Además, nuestros resultados confirman que las lesiones de PV pueden anularse clínica e histológicamente, mediante la administración de un fármaco previamente utilizado en pacientes, como es el erlotinib. Y finalmente, nuestros hallazgos pueden indicar que la activación de receptores de la familia HER en el PV, los cuales están localizados mayoritariamente en la capa basal, podría contribuir a localizar las lesiones acantolíticas a nivel suprabasal. Posteriormente, la activación de estos receptores en la capa basal de la epidermis podría poner en marcha distintas vías de señalización intracelular que condujesen a la acantólisis final observada en el PV.

En condiciones normales, los receptores HER pueden desencadenar una cascada de señales intracelulares a través de dos mecanismos diferentes. Por una parte, diferentes ligandos (factores de crecimiento) pueden estimular las células que expresan HER a través de mecanismos paracrinos o autocrinos. Se han descrito varios ligandos en mamíferos (heregulina, neuroregulina 2 y 3, epiregulina, betacelulina, factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento tisular alfa (TGF- α), biregulina y anfiregulina), todos ellos con un dominio EGF-like, lo que les da una afinidad diferente para cada una de las isoformas HER (Jones et al, 1999; Holbro et al, 2004). Además, la activación de los receptores HER podría ser independiente de la unión de los ligandos al receptor. Este mecanismo de activación de HER acarrea la estimulación de las tirosin-quinásas citoplasmáticas como Jak y Src, las cuales pueden fosforilar directamente los receptores HER (Mosesson et al, 2004).

De todos los ligandos que hemos analizado en nuestro estudio del PV *in vivo*, hemos podido observar un importante y significativo aumento sólo de la betacelulina, TGF- α y EGF, hallazgo nunca antes descrito en el PV. El papel exacto de estos tres ligandos en la epidermis es todavía desconocido en las lesiones de PV. A su vez, no sabemos si pueden intervenir en el PV otros ligandos no estudiados en el presente trabajo. Tampoco sabemos si los mismos ligandos actúan de igual manera a lo largo de toda la enfermedad de cada paciente, o por el

contrario en momentos de menor actividad puede cambiar el perfil de ligando operativos. Recientemente, la betacelulina ha sido implicada en la regulación del desarrollo del folículo piloso, la inducción del ciclo folicular y la promoción de la angiogénesis en la piel tras las heridas (Schneider et al, 2008). El TGF- α y el EGF podrían tomar parte en la proliferación y la regulación de la regeneración del tejido epidérmico (Maas-Szabowski et al, 2003; Fauschou et al, 2008). Normalmente, estos tres ligandos muestran una mayor afinidad por HER1/2 que otras isoformas de HER, mientras que la biregulina y la heregulina, no estudiadas en el presente trabajo, tienen mayor afinidad por HER3 (Jones et al, 1999).

Después del proceso de dimerización de las diferentes isoformas del receptor HER (Yarden et al, 2001; Hynes et al, 2001; Prenzel et al, 2001; Holbro et al, 2004; Mosesson et al, 2004; Bennisroune et al, 2004; Marmor et al, 2004; Herbst et al, 2004) se produciría la activación selectiva de vías de señalización intracelular en las células basales de la epidermis dependiendo de los patrones de isoformas HER, y de los ligandos que se unirían en cada caso (Yarden et al. 2001; Yarden and Sliwkowski, 2001). Por tanto, nuestro estudio sugiere por primera vez que en el PV se produce activación de las isoformas HER (HER1, HER2, HER3) mediante la unión de ligandos específicos. No obstante, no sabemos si el aumento de expresión de estos ligandos está causado por la unión de la IgG-PV a los queratinocitos antes de la acantólisis o es inducida por la disociación celular. Además, no está claro de que células proceden estos ligandos: si de los queratinocitos o de otras células. Este hecho es un interesante punto de partida para futuras investigaciones en el PV.

Nuestro grupo ha demostrado que la quinasa Src tiene un papel relevante en el PV, y que su inhibición anula la enfermedad en un modelo murino (Sánchez-Carpintero et al, 2004). Recientemente, un estudio ha establecido también que eventos recientes en la acantólisis del PV están mediados por la activación de la Src a través de la fosforilación del EGFR, y están asociados con el colapso del citoesqueleto celular (Chernyavsky et al, 2007). Estos autores sugieren que el aumento de la actividad de esta quinasa produciría una fosforilación en el receptor de HER1, activándose de esta manera, y facilitando la puesta en marcha de varias vías de señalización intracelular (Chernyavsky et al, 2007). Sin embargo, otro estudio ha sugerido que la pérdida de adhesión mediada por Dsg y la disociación queratinocitaria en el PV es independiente de la activación del EGFR y la Src. Los autores de este trabajo encuentran que en cultivos de queratinocitos el receptor HER1 en la superficie celular no se fosforila en los residuos de Tir⁸⁴⁵, que es el lugar donde la quinasa Src actúa en ese receptor. Además, no observan inhibición de la acantólisis celular cuando en el cultivo añaden un

inhibidor de EGFR o de Src. Concluyen que ante estos hallazgos no puede afirmarse que los receptores HER y la quinasa Src tengan un papel en la acantólisis del PV (Heupel et al, 2009).

Sin embargo, nuestros resultados en el presente trabajo no se corresponden con estos hallazgos. Por una parte, los estudios llevados a cabo en cultivos celulares siempre tienen el riesgo de no poner en marcha todos los mecanismos que operan en el proceso inflamatorio como ocurre en un modelo *in vivo*. Por otra parte, en nuestro estudio partimos del hallazgo de un aumento de P-Src principalmente en capa basal (aumento significativo cuando se compara con lo observado tras administrar solamente IgG-SN), y además encontramos inhibición de la acantólisis cuando administramos en los ratones PP1 o herbimicina (Sánchez-Carpintero et al, 2004). Así pues, nuestros hallazgos muestran que el papel de la Src en el PV no es fosforilando el EGFR, como proponen Chernyavsky et al (Chernyavsky et al, 2007), sino que al contrario, es la activación de los receptores HER la que activa la Src. Ya que la fosforilación de Src disminuyó casi a la mitad (de forma estadísticamente significativa) después de administrar erlotinib (inhibidor de HER1, HER2, HER3). Por tanto, tomando en conjunto todos estos resultados, podemos concluir que en el PV en un modelo murino se produce un aumento de la P-Src, dependiente de la activación de las isoformas HER. El papel de esta quinasa es relevante en la enfermedad desde el momento que se demuestra que su inhibición anula la aparición de acantólisis *in vivo* en nuestro modelo de estudio.

En todas las células existe un equilibrio entre los mecanismos que regulan la proliferación de las células, y aquellos otros que inducen la apoptosis celular y por tanto la muerte de las células, con inhibición del crecimiento de los tejidos. Entre los sistemas que intervienen en este equilibrio se incluyen los receptores HER y la mTOR. La mTOR es una quinasa que pertenece a la vía de señalización PI3K. A esta vía pertenece también la Akt, una quinasa que fosforila en residuos serina/treonina, y que es conocida por ser un regulador de la mTOR a través de un efecto de fosforilación en el residuo Ser²⁴⁸ (Nave et al, 1999; Sekulic et al, 2000). El efecto proliferativo celular de la mTOR puede llevarse a cabo a través de la vía PI3K (Asnaghi et al, 2004; LoPiccolo et al. 2008; Kalyankrishna S et al. 2006). Una muestra de este efecto de la mTOR se comprueba con la administración de la rapamicina (inhibidor de la mTOR), encontrándose una supresión de la síntesis de proteínas y provocando una interrupción del ciclo celular en fase G1 (Aoki et al, 2001; Asnaghi et al, 2004). Adicionalmente, otros estudios han demostrado que la mTOR podría también mediar en la

apoptosis (muerte celular) (Asnaghi et al, 2004), a través de vías de señalización que operan cuando se produce un daño en los microtúbulos del citoplasma celular (Haldar et al, 1998; Chadebech et al, 1999; Roudier et al, 2006; Asnaghi et al, 2004). Este proceso de muerte apoptosis se activa mediante fosforilación e inactivación de mediadores anti-apoptóticos como el Bcl-2 en fase G2-M del ciclo celular (Calastretti et al, 2001; Asnaghi et al, 2004). El mecanismo pro-apoptótico de la mTOR puede también ser inhibido por la acción de la rapamicina (Calastretti et al, 2001; Asnaghi et al, 2004). Es interesante la observación de que este proceso inductor de apoptosis mediado por la mTOR solamente se consigue si previamente se consigue anular la acción de la Akt (Asnaghi et al, 2004). Por otra parte, la activación de Akt promueve la supervivencia de algunos tipos celulares, entre ellos los queratinocitos (O'Shaughnessy et al, 2007), mediante la regulación de algunas proteínas pro-apoptóticas como Bad y el factor de transcripción FKHRL-1 (Franke et al, 1997; Brunet et al, 1999).

Por consiguiente, nuestros hallazgos de inducción de apoptosis en la capa basal de la epidermis en las lesiones de PV, junto a unos niveles basales muy reducidos de Akt, se corresponden con los resultados descritos en la literatura.

Aunque la vía PI3K/Akt está considerada como una vía fundamental para la activación de mTOR (Marmor et al, 2004), los resultados en el presente estudio sugieren que la fosforilación de la quinasa mTOR podría producirse por un mecanismo independiente de esta vía en las células basales en las lesiones de PV. En primer lugar, uno de los hallazgos más interesantes de nuestro estudio ha sido la observación de casi una ausencia completa de P-Akt en las células basales de las lesiones de PV, similar a la observada tras la inyección de IgG-SN, erlotinib, rapamicina y PP1 más IgG-PV. Esto podría explicarse por el hecho previamente descrito de que normalmente la Akt se expresa en las células suprabasales y parabasales (células post-mitóticas) en la epidermis de ratones neonatos, pero no en las células basales epidérmicas (Calautti et al, 2005; O'Shaughnessy et al, 2007; Müller et al, 2008). En este sentido, se ha descrito que la activación de la vía PI3K/Akt podría ser clave para la diferenciación de los queratinocitos sólo en las células suprabasales de la epidermis, cuando las células basales post-mitóticas han iniciado la migración hacia la capa espinosa de la epidermis (Calautti et al, 2005). Así pues, en las células basales de la epidermis en el PV se produciría un desequilibrio entre los niveles muy bajos de Akt, y los niveles elevados de mTOR que se inducen tras la administración de IgG-PV. Quizá, este desequilibrio se favorecería, además, por la presencia selectiva de los receptores HER en la capa basal, lo

que conduciría a las células a la apoptosis. Nuestra observación de un descenso significativo de la P-mTOR sin cambios en la P-Akt, asociado a una importante reducción de la apoptosis y una inhibición de la acantólisis en la capa basal de la epidermis tras el pre-tratamiento con erlotinib corrobora esta hipótesis. Además, la importancia del desequilibrio de Akt/mTOR en las lesiones de PV se pone de manifiesto con nuestra observación de la inhibición de la acantólisis y la apoptosis, sin cambios en la P-Akt, en la capa basal tras el pre-tratamiento con rapamicina (inhibidor de la actividad de P-mTOR). Finalmente, otro hallazgo interesante de nuestro estudio fue la inhibición de la apoptosis y la acantólisis en las células basales de la epidermis tras el pretratamiento con PP1, asociado a una regulación a la baja de P-mTOR sin cambios en la P-Akt, indicando que la mTOR podría estar regulada por la quinasa Src, tal y como ha sido descrito por otros autores (Vojtechova et al, 2008). Todo esto, nos ha llevado a formular la hipótesis de que la IgG-PV podría causar el desequilibrio de las actividades de Akt/mTOR en las células basales de la epidermis, al menos en parte, como consecuencia de la señalización *downstream* a través de los receptores HER con la activación de mTOR mediada por la P-Src, sin la posibilidad de una regulación al alza en esas células de la actividad de Akt.

La quinasa mTOR realiza su acción a través de los complejos mTORC1 y mTORC2. No obstante, no es del todo conocido como esta quinasa ejerce su acción mediante estos complejos. Teniendo en cuenta que tanto mTORC1 como mTORC2 podrían ser estimulados por los factores de crecimiento, y que el mecanismo de acción del inhibidor de mTOR rapamicina depende del tipo de complejo de mTOR (Sarbasov et al, 2006; Jiang et al, 2006; Corradetti and Guan, 2006; Sancak et al, 2008; Foster, 2009), son necesarios más estudios para conocer como esta quinasa participa en el desarrollo de la apoptosis y la acantólisis en el PV.

La apoptosis es un proceso caracterizado por una serie de alteraciones en la arquitectura celular que contribuyen a la muerte de las células y también las prepara para ser eliminadas por los fagocitos, impidiendo las respuestas inmunes no deseadas (Taylor et al, 2008). Varios estudios han demostrado que la acantólisis está asociada a la presencia de células apoptóticas (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Puviani et al, 2003; Palacho et al, 2004; Wang et al, 2004; Frusic-Zlotkin et al, 2005). No obstante, no está del todo claro como estos dos procesos están relacionados en las lesiones de PV.

En nuestro estudio hemos podido demostrar que antes de evidenciarse el fenómeno de acantólisis suprabasal en el PV se inicia el proceso de apoptosis en las células basales de la

epidermis 3 horas antes. Estos mismos hallazgos han sido observados en estudios *in vitro* (Frusic-Zlotkin et al, 2005), y nos ayudan a confirmar que los mecanismos de apoptosis pueden iniciarse antes de que sea evidente la acantólisis suprabasal. Estos mismos hallazgos han sido confirmados también en estudios *in vivo* llevados a cabo en ratones pero con suero de pacientes con PF (Li et al, 2009). Recientemente se ha publicado un estudio que señala que puede aparecer acantólisis en ausencia de apoptosis en las lesiones cutáneas de pacientes afectos de PV (Schmidt et al, 2009) y por consiguiente que la apoptosis no es necesaria para que aparezca acantólisis en el PV (Schmidt et al, 2009; Schmidt and Waschke, 2009). Además, el mismo grupo de autores afirma que la IgG-PV causa la disociación de queratinocitos humanos en cultivo celulares sin evidencia de una alteración en la morfología nuclear o fragmentación del DNA. Estos hallazgos son difícilmente compatibles a aquellos descritos por numerosos autores (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Puviani et al, 2003; Pelacho et al, 2004; Wang et al, 2004; Frusic-Zlotkin et al, 2005) incluido nuestro grupo de trabajo. No sabemos como explicar estos hallazgos. Quizás, el análisis de todos los estudios no lleva a pensar que quizá, cuando deseamos conocer todos los mecanismos que operan de forma coordinada en un proceso tan articulado y complejo como es el del PV, es necesario siempre utilizar modelos *in vivo*. Solamente cuando se utiliza un modelo *in vivo* todos los mecanismos potenciales y vías de señalización que participan en las lesiones de PV pueden interactuar entre sí. No obstante, se necesitan más estudios para esclarecer este hecho.

En el proceso de apoptosis del PV se han implicado mediadores, entre los que destaca el Fas-L, el cual se produciría por la IgG-PV (Puviani et al, 2003) pero también la IgG-PV podría desencadenar directamente la apoptosis (Pelacho et al, 2004). En ambos casos se produce el aumento de actividad caspasa. Las caspasas, a su vez, podrían romper directamente la Dsg3 y otras proteínas desmosomales, causando la rotura de los desmosomas (Weiske et al, 2001). Más recientemente, algún trabajo ha demostrado un papel relevante de la p38MAPK en la apoptosis del PV, mostrando un papel directo sobre los microtúbulos del citoplasma celular (Berkowitz et al, 2005; Lee et al, 2009).

En nuestro estudio, hemos demostrado que la apoptosis podría estar inducida por un incremento de la P-mTOR en las células basales de la epidermis, lo cual se ha visto que induce la fosforilación *downstream de* Bcl-2, y anulándose así su acción anti-apoptótica (Asnaghi et al, 2004), tal y como hemos comentado. Nuestros hallazgos, por tanto, indican que la activación de la mTOR inducida por la IgG-PV podría primero preceder y después inducir la activación de la apoptosis, ya que la administración de la rapamicina inhibió la

apoptosis en nuestro estudio. A su vez, los mecanismos, tanto de la apoptosis como de la acantólisis, deberían actuar de forma coordinada, pero no el uno sin el otro, ya que la administración de fármacos como la rapamicina, al inhibir la mTOR impide no solo la apoptosis sino también la acantólisis. Las quinasas Akt y mTOR han sido implicadas en la regulación de la supervivencia celular y son consideradas mediadores de la supervivencia o muerte celular (Franke et al, 1997; Datta et al, 1999; Kim et al, 2002; Calautti et al, 2005). Por tanto, puede desprenderse de nuestros hallazgos que el desbalance Akt/mTOR puede contribuir de forma muy significativa a la apoptosis en el PV, y también por un mecanismo todavía no aclarado, a la aparición de acantólisis en el PV. Otro hallazgo derivado de nuestro estudio, y que reafirma aun más la relación tan estrecha entre apoptosis/acantólisis en el PV, es el de una ausencia de apoptosis y acantólisis en la piel de los ratones cuando administramos un inhibidor pan-caspasa. Estos mismos resultados han sido ratificados por otros autores tanto en PV (Brunet et al, 1999; Wang et al, 2004) como en PF (Li et al, 2009). Finalmente, el papel relevante de la mTOR en la apoptosis/acantólisis en el PV la hemos puesto de manifiesto al observar que la administración de PP1 (inhibidor de Src), de erlotinib (inhibidor de isoformas HER) y de rapamicina (inhibidor de mTOR) no solamente produjo una ausencia de acantólisis sino también de apoptosis en los ratones.

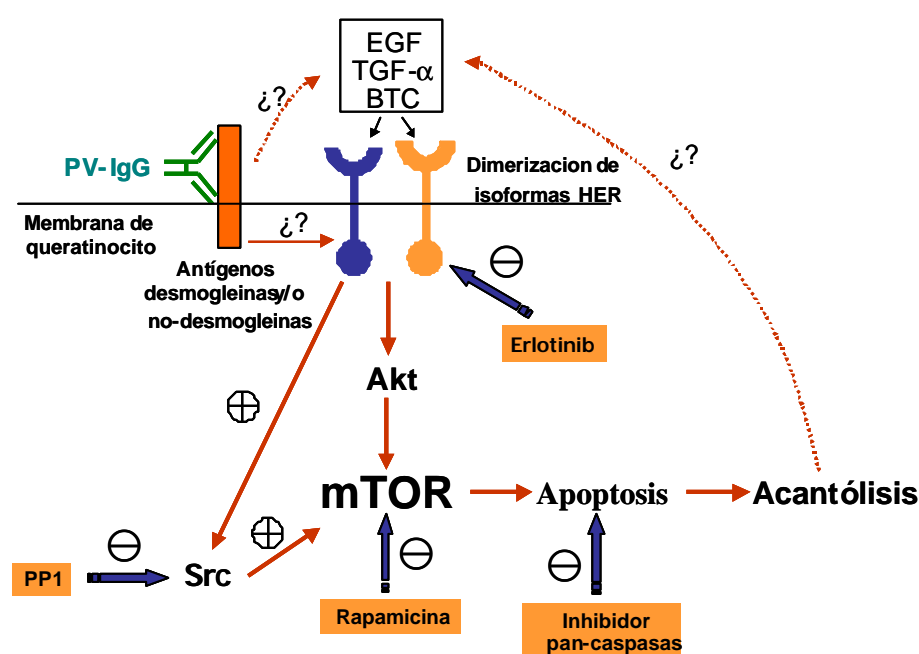


Gráfico que muestra nuestra hipótesis de trabajo, para explicar cómo puede intervenir en la acantólisis y en la apoptosis en el pénfigo vulgar el aumento en la expresión de las isoformas HER y de la p-mTOR.

En resumen, considerando todos los resultados obtenidos en nuestro estudio y aquellos encontrados en la literatura, podemos concluir que en las lesiones de PV existe una relación estrecha entre los mecanismos de apoptosis y de acantólisis en la capa basal. Los autoanticuerpos IgG-PV se unen a sus receptores de Dsg, y quizá también a otros no desmogleínicos, localizados en la superficie de los queratinocitos de la epidermis en sus 2/3 inferiores, como se observa mediante IFD. Sin embargo, solamente se producen las lesiones de acantólisis a nivel suprabasal debido a que solamente a este nivel se ponen en marcha vías de señalización intracelulares que producen la rotura de los desmosomas. Hemos observado que dentro de las vías se produce un desbalance Akt/mTOR que podría inducir los mecanismos de apoptosis/acantólisis. A su vez, la activación de la quinasa Src, a través de una activación de las isoformas HER, podrían también tener un papel en esta enfermedad, induciendo la actividad mTOR en la capa basal, amplificando su habilidad para causar apoptosis y el despegamiento de las células (Orlov et al, 2006). Estos hallazgos, abren la puerta a nuevos tratamiento más específicos en el PV, algunos de los cuales ya se están empleando hoy en día, como recientemente se ha publicado (Saggar et al, 2008).

6. CONCLUSIONES

1. Hemos observado un aumento significativo de la expresión de p-HER1, p-HER2 y p-HER3 en la capa basal de la epidermis de los ratones tras la administración de IgG-PV, respecto a la observada tras la administración de IgG-SN, hecho nunca antes descrito en un modelo *in vivo* de PV. Estos hallazgos podrían indicar que la activación de receptores HER en el PV contribuiría a localizar las lesiones acantolíticas únicamente de forma selectiva en la capa basal de la epidermis. Además, el pre-tratamiento de los ratones con el inhibidor de tirosín quinasa erlotinib (inhibidor de HER1, HER2 y HER3), anuló la acantólisis clínica e histológicamente en los ratones, lo que subraya la importancia de estos receptores en la patogénesis de esta enfermedad.
2. Después de administrar a los ratones IgG-PV, pudimos observar un importante y significativo aumento de la expresión de betacelulina, TGF- α y EGF (ligandos de HER) en la capa basal de la epidermis de los ratones, hallazgo nunca antes descrito en el PV, lo que sugiere que en el PV podría producirse una activación de las isoformas HER (HER1, HER2, HER3) mediante la unión de ligandos específicos.
3. En nuestro modelo murino de PV constatamos un aumento significativo de p-Src en la capa basal de la epidermis de los ratones tras administrar la IgG-PV, respecto a la observada tras la inyección de IgG-SN. Este hecho se acompañó de una inhibición de la acantólisis cuando administramos a los ratones PP1, inhibidor de Src. Asimismo, hemos podido observar que el aumento de la fosforilación de Src se anuló mediante el pretratamiento de los ratones con erlotinib. Podemos concluir entonces que en el PV en un modelo murino se produce un aumento de la p-Src, dependiente de la activación de las isoformas HER.
4. La expresión de p-Akt en las células basales de la epidermis de los ratones fue casi indetectable tras la administración de IgG-PV y similar a la observada tras la inyección de erlotinib, rapamicina y PP1 seguida de la de IgG-PV, o IgG-SN. Por el contrario, hemos observado un aumento significativo de p-mTOR en las células basales epidérmicas tras la inyección de IgG-PV. Por lo tanto, en la capa basal de la epidermis en el PV se produciría un desequilibrio entre los niveles muy bajos de actividad de Akt y los niveles elevados de la de mTOR, tras la administración de IgG-PV. La importancia de este hallazgo se pone de manifiesto con nuestra observación de la inhibición de la acantólisis y la apoptosis, sin cambios en la p-Akt, que se produce en la capa basal por el pre-tratamiento con rapamicina (inhibidor de la actividad de p-mTOR). Así mismo, hemos encontrado un descenso significativo de la p-mTOR sin cambios en la p-Akt,

asociado a una importante reducción de la apoptosis y una inhibición de la acantólisis en la capa basal de la epidermis por el pre-tratamiento con erlotinib, lo que sugiere que el desequilibrio de mTOR/Akt se favorecería, además, por la presencia selectiva de los receptores HER en la capa basal.

5. Otro hallazgo interesante de nuestro estudio fue la inhibición de la apoptosis y la acantólisis en las células basales de la epidermis tras el pretratamiento con PP1, asociado a una regulación a la baja de p-mTOR sin cambios en la p-Akt. Este hecho sugiere que la mTOR podría mediar en el efecto de la quinasa Src en el PV.
6. Las características de nuestro modelo de PV nos ha permitido observar que la apoptosis en la capa basal de la epidermis aparece 3 horas antes que la acantólisis después de administrar a los ratones IgG-PV. Este hecho nos lleva a afirmar que la apoptosis es un fenómeno previo a la acantólisis en el PV en un modelo murino. Pensamos que los dos procesos se producen de forma coordinada, uno antes que el otro, pero no el uno sin el otro. Además, hemos observado una ausencia de apoptosis y acantólisis en la piel de los ratones cuando administramos un inhibidor pan-caspasa, lo que reafirma aun más la relación tan estrecha entre apoptosis/acantólisis en el PV. Finalmente, hemos constatado el papel relevante de la mTOR en la apoptosis/acantólisis en el PV ya que el pretratamiento con PP1 y erlotinib, inhibidores de la actividad quinasa de Src y HER, que evitan la activación de mTOR, así como la administración del inhibidor de mTOR rapamicina no solamente produjo una ausencia de acantólisis sino también de apoptosis en los ratones tratados con IgG-PV.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta E, Ivanyi L. Comparison of the reactivity of various epithelial substrates for the titration of pemphigus antibodies by indirect immunofluorescence. *Br J Dermatol* 1982; **107**:537-41.
- Aguado L, Marquina M, Pretel M, et al. Lesions of pemphigus vulgaris on irradiated skin. *Clin Exp Dermatol* 2009; Jan 12.
- Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, et al. Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:7658-62.
- Akhyani M, Chams-Davatchi C, Naraghi Z. Cervicovaginal involvement in pemphigus vulgaris: a clinical study of 77 cases. *Br J Dermatol* 2008; **158**:478-82.
- Alemà S, Salvatore AM. p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773**:47-58.
- Allen E, Yu QC, Fuchs E. Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *J Cell Biol* 1996; **133**:1367-82.
- Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 199; **410**:83-6.
- Amagai M, Klaus-Kovtun, V, Stanley, JR Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; **67**:869-77.
- Amagai M, Karpati S, Prussick R. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 1992; **90**:919-26.
- Amagai M, Hashimoto T. and Shimizu N. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 1994; **94**:59-67.
- Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, et al. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 1996; **106**:351-5.
- Amagai M, Komai A, Hashimoto T, et al. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999; **140**:351-7.
- Amagai M., Tsunoda K, Suzuki H. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 2000; **105**:625-31.
- Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999; **40**:167-70.
- Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; **306**:1189-96.

Anhalt GJ, Hill GO, Diaz LA, et al. Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. *J Immunol* 1986;**137**:2835-40.

Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:136-41.

Aoyama Y, Owada Mk, Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol* 1999;**29**:2233-40.

Arnemann J, Sullivan KH, Magee AI, et al. Stratification-related expresión of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci* 1993;**104**:741-50.

Arredondo J, Chernyavsky A, Karaouni A, et al. Novel Mechanisms of Target Cell Death and Survival and of Therapeutic Action of IVIg in Pemphigus. *Am J Pathol* 2005;**167**:1531-44.

Asnagli L, Bruno P, Priulla M, et al. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res* 2004;**50**:545-9.

Asworth J, Cox NH, Pickard WR, et al. Death in pemphigus vulgaris caused by coe ger gastrointestinal hemorrhage. *J Am Acad Dermatol* 1987;**16**:394-5.

Baruzzi A, Cavegion E, Berton G. Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**:2175-90.

Barthelemy H, Frappaz A, Cambazard F, et al. Treatment of nine cases of pemphigus vulgaris with cyclosporine. *J Am Acad Dermatol* 1988;**18**:1262-6.

Beissert S, Werfel T, Frieling U, et al. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2006;**142**:1447-54.

Benati D, Baldari CT. SRC family kinases as potential therapeutic targets for malignancies and immunological disorders. *Curr Med Chem* 2008;**15**:1154-65.

Bennasroune A, Fickova M, Gardin A, et al. Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Mol Biol Cell* 2004;**15**:3464-74.

Benoit Corven C, Carvalho P, Prost C, et al. Treatment of pemphigus vulgaris by azathioprine and low doses of prednisone (Lever scheme). *Ann Dermatol Venereol* 2003;**130**:13-5.

Benzel, Bansal A, Browning BL, et al. Interactions among genes in the ErbB-neuregulin signalling network are associated with increased susceptibility to schizophrenia. *Behavioral and Brain Functions* 2007;**3**:31.

- Berkowitz P, Hu P, Liu Z, et al. Desmosome signalling inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 2005;**280**:20780-4.
- Berkowitz P, Hu P, Warren S, et al. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:12855-60.
- Berkowitz P, Diaz LA, Hall RP. Induction of p38MAPK and HSP 27 phosphorylation in pemphigus patient skin. *J Invest Dermatol* 2007;**128**:738-40.
- Bhol K, Mohimen A, Ahmed AR. Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. *Dermatology* 1994;**189**:85-9.
- Bhol K, Mohimen A, Ahmed AR. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:5239-43.
- Bierkamp C, Schwarz H, Huber O, et al. Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development* 1999;**126**:371-81.
- Bjomsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target of cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2004;**4**:335-48.
- Bordel-Gomez MT, Sanchez-Estella J, Yuste-Chaves M et al. Familiar pemphigus vulgaris: immunogenetic study of HLA class II antigens. *Actas Dermosifiliogr* 2006; **97**:509-13.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow *Trends Biochem Sci* 2001;**26**:657-64
- Brooks WS, Lee YY, Abell E, et al. Comparison of IgG subclasses and complement binding activity of autoantibodies from patients with bullous pemphigoid and pemphigus. *J Clin Lab Anal* 1989;**3**:307-11.
- Brunet A, Bonni A, Zigmund M, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;**96**:857-68.
- Bystryn JC, Steinman NM. The adjuvant therapy of pemphigus. An update. *Arch Dermatol* 1996;**132**:203-12.
- Bystryn 2003. How should pemphigus be treated?. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;**16**:562-3.
- Bystryn JC, Grando SA. A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis. *J Am Acad Dermatol* 2006; **54**:513-6.
- Calastretti A, Rancati F, Ceriani MC, et al. Rapamycin increases the cellular concentration of the BCL-2 protein and exerts an anti-apoptotic effect. *Eur J Cancer* 2001;**37**:2121-8.
- Calastretti A, Bevilacqua A, Ceriani C, et al. Damaged microtubules can inactivate BCL-2 by means of the mTOR kinase. *Oncogene* 2001;**20**:6172-80.

- Calautti E, Li J, Saoncella S, Brissette JL, et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *J Biol Chem* 2005;**280**:32856-65.
- Calkins CC, Setzer SV, Jennings JM, et al. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem* 2006;**281**:7623-34.
- Candelari R, de Bruin A, Baumann D, et al. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 2001;**153**:823-34.
- Capon F, Bharkhada J, Cochrane NE, et al. Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2006;**154**:67-71.
- Carducci M, Calcaterra R, Franco G, et al. Nail involvement in pemphigus vulgaris. *Acta Derm Venereol* 2008;**88**:58-60.
- Chadebech P, Bricchese L, Baldin V, et al. Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**262**:823-7.
- Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, et al. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002; **147**:261-5.
- Chernyavsky AI, Arredondo J, Kitajima Y, et al. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem* 2007;**282**:13804-12.
- Cianchini G, Corona R, Frezzolini A, et al. Treatment of severe pemphigus with rituximab: report of 12 cases and a review of the literature. *Arch Dermatol* 2007;**143**:1033-8.
- Cohen . Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem J* 1997;**326**:1–16.
- Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 2006;**25**:6347-60.
- Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 2003;**193**:10-21
- Cremniter D, Baudin M, Roujeau JC, et al. Stressful life events as potential triggers of pemphigus. *Arch Dermatol* 1998;**134**:1486-7.
- Daoud YJ, Cervantes R, Foster CS, et al. Ocular pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2005; **53**:585-90.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;**13**:2905-27.
- De Bruin A, Candelari R, Williamson L, et al. Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 2007;**16**:468-75.

De Potter IY, Poumay Y, Squillace KA, et al. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp Cell Res* 2001;**271**:315-28.

Demochowski M, Hashimoto T, Garrod DR, et al. Desmocollins I and II are recognized by certain sera from patients with various types of pemphigus, particularly Brazilian pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 1993;**100**:380-4.

Diaz LA, Giudice GJ. End of the century overview of skin blisters. *Arch Dermatol* 2000;**136**:106-12.

Diercks GF, Pas HH, Jonkman MF. The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2009;**160**:460-1.

Ding X, Aoki V, Mascaró JM Jr, et al. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 1997;**109**:592-6.

Ding X, Diaz LA, Fairley JA, et al. The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. *J Invest Dermatol* 1999;**112**:739-43.

Eberhard Y, Burgos E, Gagliardi J, et al. Cytokine polymorphism in patients with pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2005;**296**:309-13.

Emery DJ, Diaz LA, Fairley JA. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. *J Invest Dermatol*. 1995;**104**:323-8.

Eming R, Hertl M. Immunoabsorption in pemphigus. *Autoimmunity* 2006;**39**:609-16.

Enk AH, Know J. Mycophenolate is effective in the treatment of pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1999;**135**:54-6.

Esaki C, Seishima M, Yamada T, et al. Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1, 4, 5-triphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 1995;**105**:329-33.

España A, Diaz LA, Mascaró JM Jr. Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;**85**:83-9.

España A, Fernández-Galar M, Lloret P, et al. Long-term complete remission of severe pemphigus vulgaris with monoclonal anti-CD20 antibody therapy and immunophenotype correlations. *J Am Acad Dermatol* 2004; **50**: 974-6.

España A, Fernandez S, del Olmo J, et al. Ear, nose and throat manifestations in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2007;**156**:733-7.

España A, Panizo C, Fernandez S, et al. Remisión clínica completa prolongada en pacientes con pénfigo vulgar grave después del tratamiento con ciclos intravenosos de ciclofosfamida. *Actas Dermosifiliogr* 2009;**100**:113-20.

Evangelista F, Dasher DA and Diaz LA. The prevalence of autoantibodies against E-cadherin in pemphigus. *J Invest Dermatol* 2006;**126**:1710-8.

Eyre RW, Stanley JR. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 1988;**81**:807-12.

Faurschou A, Gniadecki R. TNF-alpha stimulates Akt by a distinct PKC-dependent pathway in premalignant keratinocytes. *Exp Dermatol* 2008;**17**:992-7.

Fimiani M, Rubegni P, Flori ML, et al. Treatment of pemphigus senilis with tetracycline plus nicotinamide : long term follow-up. *J Am Geriatr Soc* 1997;**45**:256-8.

Fleischli ME, Valek RH, Pandya AG. Pulse intravenous cyclophosphamide therapy in pemphigus. *Arch Dermatol* 1999;**135**:57-61.

Foster DA, Toschi A. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 2009;**8**:1026-9.

Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1602**:114-30.

Franke TF, Yang SI, Chan TO, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995; **81**:727-36.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997;**88**:435-7.

Frušić-Zlotkin M, Pergamentz R, Michel B, et al. The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells: activation of the Fas Apoptotic pathway and the use of caspase activity for pathogenicity tests of pemphigus patients. *Ann N Y Acad Sci* 2005;**1050**:371-9.

Frusic-Zlotkin M, Raichenberg D, Wang X. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity* 2006;**39**:521-30.

Futei Y, Amagai M, Ishii K, et al. Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Dermatol Sci* 2000;**26**:55-61.

Gaspar ZS, Walkden V, Wojnarowska F. Minocycline is a useful adjuvant therapy for pemphigus. *Australas J Dermatol* 1996;**37**:93-5.

Gaudry CA, Palka HL, Dusek RL, et al. Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 2001;**276**:24871-80.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Control of translation by the target of rapamycin proteins. *Prog Mol Subcell Biol* 200;**27**:143-74.

Gniadecki R, Jemec GB, Thomsen BM, et al. Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases. *Arch Dermatol Res* 1998;**290**:528-32.

Gollnick HP, Owsianowski M, Taube KM, et al. Unresponsive severe generalized pemphigus vulgaris successfully controlled by extracorporeal photopheresis. *J Am Acad Dermatol* 1993;**28**:122-4.

Gonzalez A, España A, Lopez-Zabalza MJ, et al. Correlation between profile of circulating mononuclear cells and clinical manifestations in patients with pemphigus vulgaris. *Autoimmunity* 2000;**32**:115-28.

González-Escribano MF, Jiménez G, Walter K, et al. Distribution of HLA class II aleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1998;**52**:275-8.

Grando SA. Decompensation in proteinase-inhibitor system and application of proteinase inhibitors in pemphigus and pemphigoid. *J Dermatol Sci* 1992;**4**:95-7.

Grando SA. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* 2000; **201**:290-5.

Grando SA, Pittelkow MR, Shultz LD, et al. Pemphigus: an unfolding store. *J Invest Dermatol* 2001;**117**:990.

Grando, SA. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* 2006;**15**:265-82.

Green RM, Basketter DA, Couchman JR, Rees DS. Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev Biol* 1983;**100**:506-12.

Green MC, Bystryjn JC. Effect of intravenous immunoglobulin therapy on serum levels of IgG1 and IgG4 antidesmoglein 1 and antidesmoglein 3 antibodies in pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 2008;**144**:1621-4.

Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2002;**277**:18694-702.

Haldar S, Basu A, Croce CM. Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl-2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res* 1998;**58**:1609-15.

Harari PM, Huang SM. Modulation of molecular targets to enhance radiation. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:323-5.

Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS. A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype. *Br J Dermatol* 2000;**143**:43-8.

- Hashimoto T, Ogawa MM, Konohana A, et al. Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 1990;**94**:327-31.
- Heaphy MR, Albrecht J, Werth VP. Dapsone as a glucocorticoid-sparing agent in maintenance-phase pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol*. 2005;**141**: 699-702.
- Herbst RS, Sandler AB. Overview of the current status of human epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2004;**6**:S7-S19.
- Heupel WM, Engerer P, Schmidt E. Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* 2009;**174**:475-85.
- Heymann AD, Chodick G, Kramer E et al. Pemphigus variant associated with penicillin use: a case-cohort study of 363 patients from Israel. *Arch Dermatol* 2007;**143**:704-7.
- Hietanen J, Salo OP. Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 and 1978. *Acta Derm Venereol* 1982;**62**:491-6.
- Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: Directing Key Signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;**44**:195-217.
- Hu CH, Michel B, Schiltz JR. Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1978;**90**:345-361.
- Huang CH, Chen CC, Wang CJ, et al. Using desmoglein 1 y 3 enzyme-linked immunoabsorbent assay as an adjunct diagnostic tool for pemphigus. *J Clin Med Assoc* 2007;**70**:65-70.
- Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, et al. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocrine-related cancer* 2001;**8**:151-9.
- Imao M, Nagaki M, Imose M, et al. Differential caspase-9-dependent signaling pathway between tumor necrosis factor receptor- and Fas-mediated hepatocyte apoptosis in mice. *Liver Int* 2006;**26**:137-46
- Ioannides D, Hytioglou P, Phelps RG, et al. Regional variation in the expression of pemphigus foliaceus, pemphigus erythematosus, and pemphigus vulgaris antigens in human skin. *J Invest Dermatol* 1991;**96**:159-61.
- Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2000;**136**: 868-72.
- Iraji F, Yoosefi A. Healing effect of Pilocarpine gel 4% on skin lesions of pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 2006;**45**:743-6.
- Ishii K, Amagai M, Hall RP, et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997;**159**:2010-7.

- Ishizawar R, Parsons SJ. C-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004;**6**:209-14.
- Iwatsuki K, Takigawa M, Hashimoto T, et al. Can pemphigus vulgaris become pemphigus foliaceus? *J Am Acad Dermatol* 1991;**25**:797-800.
- Iwatsuki K, Harada H, Yokote R, et al. Differences in the expresión of pemphigus antigens during epidermal differentiation. *Br J Dermatol* 1995;**133**:209-16.
- Jadhav V, Matchett G, Hsu FP, et al. Inhibition of Src tyrosine kinase and effect on outcomes in a new in vivo model of surgically induced brain injury. *J Neurosurg* 2007;**106**:680-6.
- Jiang X, Yeung RS. Regulation of microtubule-dependent protein transport by the TSC2/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer Res* 2006;**66**:5258-69.
- Jiao D, Bystryn JC. Sensitivity of indirect immunofluorescence, substrate specificity, and immunoblotting in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1997;**37**:211-6.
- Jolles S. A review of high-dose intravenous immunoglobulin (hdIVIg) in the treatment of the autoimmune blistering disorders. *Clin Exp Dermatol* 2001;**26**:127-31.
- Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. *J Clin Immunol* 1988;**8**:43-9.
- Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of EGF domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999;**447**:227-31.
- Kageshita T, Kojo, Jono M. Pemphigus vulgaris: a patient who vomited esophageal mucosa. *Nishinohon J Dermatol* 1982;**44**:949-52.
- Kalish, RS. Possible role for non-desmoglein antigen in pemphigus. *J Invest Dermatol* 2001;**117**:995.
- Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;**24**:2666-72.
- Kapprell HP, Owaribe K, Franke WW. Identification of a Basic protein of Mr 75'000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *J Cell Biol* 1988;**106**:1679-91.
- Kawana S, Hashimoto T, Nishikawa T, et al. Changes in clinical features, histologic findings, and antigen profiles with development of pemphigus foliaceus from pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1994;**130**:1534-8.
- Kiguchi K, Bol D, Carbajal S, et al. Constitutive expression of erbB2 in epidermis of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and spontaneous skin tumor development. *Oncogene* 2000;**19**:4243-54.

- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;**110**:163-75.
- Kitajima Y, Inoue S, Yaoita H. Effects of pemphigus antibody on the organization of microtubules and keratin-intermediate filaments in cultured human keratinocytes. *Br J Dermatol* 1986;**114**:171-9.
- Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999;**4**:137-44.
- Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, et al. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000;**77**:25-79.
- Klymkowsky MW, Williams BO, Barish GD, et al. Membrana-anchored plakoglobin have multiple mechanism of action in Wtn signaling. *Mol Biol Cel* 1999;**10**:3151-69.
- Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 1997;**137**:1091-102.
- Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtum V, et al. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med* 1989;**321**:631-5.
- Kowalczyk AP, Borgwardt JE, Green KJ. Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Invest Dermatol* 1996; **107**:293-300.
- Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, et al. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *Br J Dermatol* 2000;**143**:337-42.
- Kyriakis KP, Tosca AD. Epidemiologic observations on the natural course of pemphigus vulgaris. *In J Dermatol* 1998;**37**:215-9.
- Lapiere JC, Guitart J, Ettlín DA, et al. Preferential activation of the complement system in the lower epidermis of patients with pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1998;**139**:851-4.
- Lee HE, Berkowitz P, Jolly PS, et al. Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem* 2009;**284**:12524-32.
- Legan PK, Yue KKM, Chidgey MAJ, et al. The bovine desmocollin family: A new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biol* 1994;**126**:507-18.
- Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* 1994;**19**:459-63.

- Lever WF, Schaumburg-Lever G. Immunosuppressants and prednisone in pemphigus vulgaris: therapeutic results obtained in 63 patients between 1961 and 1975. *Arch Dermatol* 1977;**113**:1236-41.
- Li N, Zhao M, Wang J, et al. Involvement of the apoptotic mechanism on pemphigus foliaceus autoimmune injury of the skin. *J Immunol* 2009;**182**:711-7.
- Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, et al. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 1997;**99**:31-40.
- Lin MS, Swartz SJ, Lopez A et al. T lymphocytes from a subset of patients with pemphigus vulgaris respond to both desmoglein-3 and desmoglein-1. *J Invest Dermatol* 1997;**109**:734-7.
- Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S et al. Strict correlation between uPAR and plakoglobin expression in pemphigus vulgaris. *J Cutan Pathol* 2002;**29**:540-8.
- Loiseau P, Lecleach L, Prost C, et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun* 2000;**15**:67-73.
- Lorch JH, Klessner J, Park JK, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; **279**:37191-200.
- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008;**11**:32-50.
- Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995;**60**:323-71.
- Maas-Szabowski N, Starker A, Fusenig NE. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *J Cell Sci* 2003;**116**:2937-48.
- Mahoney MG, Wang ZH, Stanley JR. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. *J Invest Dermatol* 1999;**113**:22-5.
- Malik M, Ahmed AR. Involvement of the female genital tract in pemphigus vulgaris. *Obstet Gynecol* 2005;**106**:1005-12.
- Malik M, El Tal AE, Ahmed AR. Anal involvement in pemphigus vulgaris. *Dis Colon Rectum* 2006;**49**:500-6.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signalling: navigating downstream. *Cell* 2007; **129**:1261-74.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;**58**:903-13.

- Marquina M, España A, Fernandez-Galar M, Lopez-Zabalza MJ. The role of nitric oxide synthases in pemphigus vulgaris in a mouse model. *Br J Dermatol* 2008;**159**:68-76.
- Mascaró JM Jr, España A, Liu Z. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;**85**:90-6.
- Mellinghoff IK, Sawyers CL. TORward AKTually useful mouse models. *Nat Med* 2004;**10**:579-80.
- Memar OM, Rajaraman S, Thotakura R. Recombinant desmoglein 3 has the necessary epitopes to adsorb and induce blister-causing antibodies. *J Invest Dermatol* 1996;**106**:261-8.
- Memar OM, Rady PL, Goldblum RM, et al. Human Herpesvirus 8 DNA sequences in blistering skin from patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 1997;**133**:1247-51.
- Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 2006;**33**:369-85.
- Mentink LF, Mackenzie MW, Tóth GG, et al. Randomized controlled trial of adjuvant oral dexamethasone pulse therapy in pemphigus vulgaris: PEMPULS trial. *Arch Dermatol* 2006;**142**:570-6.
- Milner Y, Metzeau P, Kiefer H, et al. Pemphigus an autoimmune disease of the skin: cell-cell separation versus membrane signaling and apoptosis in acantholysis. The decade of autoimmunity Edited by Shoenfeld Y. Amsterdam: Elsevier Science BV; 1999:606-15.
- Mimouni D, Anhalt GJ, Cummins DL et al. Treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus with mycophenolato mofetil. *Arch Dermatol* 2003;**139**:739-42.
- Mimouni D, Foedinger D, Kouba DJ, et al. Mucosal dominant pemphigus vulgaris with anti-desmoplakin autoantibodies. *J Am Acad Dermatol* 2004;**51**:62-7.
- Minogna MD, Pannone G, Lo Muzio L, et al. Catenin dislocation in oral pemphigus vulgaris. *J Oral Pathol Med* 2001;**30**:268.
- Morita H, Morisaki S, Kitano Y. Clinical trial of prostaglandin E2 on the oral lesions of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1995;**132**:165-6.
- Mosesson Y, Yarden Y. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol* 2004;**14**:262-70.
- Müller EJ, Williamson L, Kolly C, et al. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol* 2008;**128**:501-16.
- Müller R, Svoboda V, Wenzel E, et al. IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 2008;**17**:35-43.
- Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001;**45**:803-22.

- Mutasim DF. Management of autoimmune bullous diseases: pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol* 2004;**51**:859-77
- Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signalling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 6845-57.
- Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, et al. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999;**344**:427-31.
- Ndoye A, Buchli R, Greenberg B. Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998;**111**:410-6.
- Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 2000;**157**:1377-91.
- Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 2000; **275**:29466-76.
- Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, et al. Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists. *Arch Dermatol* 2004;**140**:327-34.
- Nguyen VT, Arredondo J., Chernyavsky, AI et al. Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes. *J Biol Chem* 2004;**279**: 2135-46.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;**22**:299-306.
- Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, et al. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**:876-85.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;**19**:3159-67.
- Osada K, Seishima M, Kitajima Y. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997;**108**:482-7.
- Orlov MD, Chernyavsky AI, Arredondo J, et al. Synergistic actions of pemphigus vulgaris IgG, Fas-ligand and tumor necrosis factor-alpha during induction of basal cell shrinkage and acantholysis. *Autoimmunity* 2006;**39**:557-62.
- O'Shaughnessy RFL, Welti JC, Cooke JC, et al. AKT-dependent HspB1 (Hsp27) activity in epidermal differentiation. *J Biol Chem* 2007;**282**:17297-305.

- Palleschi GM, Giomi B, Fabbri P. Ocular involvement in pemphigus. *Am J Ophthalmol* 2007;**144**:149-52.
- Pandya AG, Dyke C. Treatment of pemphigus with gold. *Arch Dermatol* 1998;**134**:1104-7.
- Paul R, Zhang ZG, Eliceiri BP, et al. Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke. *Nat Med* 2001;**7**:222-7.
- Payne AS, Ishii K, Kacir S, et al. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *J Clin Invest* 2005;**115**:888-99.
- Pelacho B, Natal C, España A, et al. Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett* 2004;**566**:6-10.
- Penneys NS. Focal adhesion kinase is expressed in acantholytic keratinocytes associated with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 1996;**135**:592-4.
- Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, et al. Pemphigus vulgaris: incidente in Jews of different ethnic groups, according to age, sex and initial lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;**38**:382-7.
- Pitoia F, Moncet D, Glorio R. Prevalence of thyroid autoimmunity in patients with pemphigus vulgaris. *Medicina (B Aires)* 2005;**65**:307-10.
- Pollack VA, Savage DM, Baker DA, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**291**:739-48.
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;**8**:11-31.
- Puviani M, Marconi A, Cozzani E, et al. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. *J Invest Dermatol* 2003; **120**:164-167.
- Qian Y, Diaz LA, Ye J, et al. Dissecting the anti-desmoglein autoreactive b cell repertoire in pemphigus vulgaris patients. *J Immunol* 2007;**178**:5982-90.
- Ratnam KV, Phay KL, Tan CK. Pemphigus therapy with oral prednisolone regimens. A 5-year study. *Int J Dermatol* 1990;**29**:363-7
- Ratnam KV, Pang BK. Pemphigus in remission: value of negative direct immunofluorescence in management. *J Am Acad Dermatol* 1994;**30**:47-50.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;**157**:1415-30.
- Reis VM, Toledo RP, Lopez A, et al. UVB-induced acantholysis in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) and pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2000;**42**:571-6.

- Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ ErbB receptor family signaling network. *Bioassays* 1998;**20**:41-8.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;**405**:847-56.
- Rosenberg FR, Sanders S, Nelson CT. Pemphigus: a 20-year review of 107 patients treated with corticosteroids. *Arch Dermatol* 1976;**112**:962-70.
- Roudier E, Mistafa O, Stenius U. Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p-53-deficient cells to cytostatic drugs. *Mol Cancer Ther* 2006;**5**:2706-15.
- Rowe A, Farrele AM, Bunker CB. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 1997;**136**:18-23.
- Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, et al. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* 1996;**135**:215-25.
- Ruocco E, Baroni A, Wolf R et al. Life-threatening bullous dermatoses: Pemphigus vulgaris. *Clin Dermatol* 2005;**23**:223-6.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008;**320**:1496-501.
- Salato VK, Hacker-Foegen MK, Lazarova Z, et al. Role of intramolecular epitope spreading in pemphigus vulgaris. *Clin Immunol* 2005;**116**:54-64.
- Saggar S, Zeichner JA, Brown TT, et al. Kaposi's sarcoma resolves after sirolimus therapy in a patient with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 2008;**144**:654-7.
- Sami N, Ahmed AR. Penile pemphigus. *Arch Dermatol* 2001;**137**:756-758.
- Sánchez-Carpintero I, Espana A, Pelacho B, et al. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol* 2004;**151**:565-70.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006;**22**:159-68.
- Schafer S, Koch PJ, Franke WW. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 1994;**211**:391-9.
- Schaefer BM, Jaeger C, Kramer MD. Plasminogen activator system in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1996; **135**:726.
- Schaller J, Niedecken HW, Biber E et al. Characterization of lymphocytic infiltrate cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Dermatol Monatsschr* 1990;**176**: 661-8.

- Schmidt E, Gutberlet J, Siegmund D, et al. Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;**296**:C162-72.
- Schneider MR, Antsiferova M, Feldmeyer L, et al. Betacellulin regulates hair follicle development and hair cycle induction and enhances angiogenesis in wounded skin. *J Invest Dermatol* 2008;**128**:1256-65.
- Schumann H, Baetge J, Tasanen K et al. The shed ectodomain of collagen XVII/BP 180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol* 2000;**156**:685-95.
- Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;**28**:727-732.
- Seishima M, Esaki C, Osada K, et al. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1, 4, 5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 1995;**104**:33-7.
- Seishima M, Satoh S, Nojiri M, et al. Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor of cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997;**109**:650.
- Seishima M, Iwasaki-Bessho Y, Itoh Y, et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. *Arch Dermatol Res* 1999;**291**:606-13.
- Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 2000;**60**:3504-13.
- Selbie LA, Hill SJ. G protein-coupled-receptor cross-talk: The fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1998;**19**:87-93.
- Serrels B, Serrels A, Mason S, et al. A novel Src kinase inhibitor reduces tumour formation in a skin carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 2009;**30**:249-57.
- Shabbir SG, Hassan M, Kazmi SA. Myasthenia gravis and pemphigus vulgaris. *J Pak Med Assoc* 1984;**34**:349-51.
- Sharma P, Mao X, Payne AS. Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J Dermatol Sci* 2007;**48**:1-14.
- Shaughnessy LM, Lipp P, Lee KD. Localization of protein kinase C epsilon to macrophage vacuoles perforated by *Listeria monocytogenes* cytolysin. *Cell Microbiol* 2007; **9**:1695-704.
- Shimizu A, Ishiko A, Ota T, et al. IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model. *J Invest Dermatol* 2004;**122**:1145-53.

- Shirakata Y, Amagai M, Hanakawa Y et al. Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expresión of desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 1998;**110**:6-8.
- Siebra MX, Santos MA, Almeida TLP, et al. Evidence for the participation of nitric oxide in pemphigus. *Braz J Med Biol Res* 2006;**39**:671-5.
- Simrak D, Cowley CM, Buxton RS et al. Tandem arrangement of the closely linked desmoglein genes on human chromosome 18. *Genomics* 1995;**25**: 591-4.
- Smith EA, Fuchs E. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol.*1998;**141**:1229-41.
- Spaeth S, Riechers R, Borradori L, et al. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2001;**144**:1183.
- Stanley JR, Yaar M. and Hawley-Nelson, P. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982;**70**:281-8.
- Stanley JR, Koulu, L. and Thivolet, C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 1984;**74**: 313-20.
- Stavropoulus PG, Zarafonitis G, Petridis A et al. Pemphigus vulgaris in two sisters. *Acta Derm Venereol* 2001;**81**:149.
- Steiner PM, Freedberg IM. Molecular and cellular biology of keratins. In: Goldsmith L Aed. Physiology, Biochemistry, and molecular Biology of the skin, 2nd edn. *New York: Oxford University Press* 1991:113-47
- Stern JNH, Keskin DB, Barteneva N et al. Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris-preliminary observations. *Clin Exp Immunol* 2008;**152**:472-81.
- Szafer F, Brautbar C, Tzfon E et al. Detection of disease-specific restriction fragment length polymorphisms in pemphigus vulgaris linked to the DQw1 and DQw3 alleles of the HLA-D region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:6542-5.
- Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, et al. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol* 1985;**84**:41-6
- Takahashi H, Amagai M, Nishikawa T, et al. Novel System Evaluating In Vivo Pathogenicity of Desmoglein 3-Reactive T Cell Clones Using Murine Pemphigus Vulgaris *J Immunol* 2008;**181**:1526-35.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, et al. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 1996;**203**:33-6.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev* 2008;**9**:231-41.

Teachey DT, Obzut DA, Cooperman J. The mTOR inhibitor CCI-779 induces apoptosis and inhibits growth in preclinical models of primary adult human ALL. *Blood* 2006;**107**:1149-55.

Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;**13**:513-609.

Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998;**5**:R97-103.

Tobin, AB. Phosphorylation of phospholipase C-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 1997;**75**:135-51.

Torzecka JD, Wozniak K, Kowalewski C, et al. Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development? *Arch Dermatol Res* 2007;**299**:239-43.

Toto P, Feliciano C, Amerio P, et al. Immune modulation in pemphigus vulgaris: role of CD28 and IL-10. *J Immunol* 2000;**164**:522-9.

Tsunoda K., Ota T and Aoki M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol* 2003;**170**:2170-8.

Turner MS, Sutton D, Sauder DN. The use of plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2000;**43**:1058-64.

Tzahar E, Levkowitz G, Karunagaran D, et al. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hereregulin isoforms. *J Biol Chem* 1994;**269**:25226-33.

Ueki H, Kohda M, Nobutoh T, et al. Antidesmoglein autoantibodies in silicosis patients with no bullous diseases. *Dermatology* 2001;**202**:16.

Ugajin T, Yahara H, Moriyama Y, et al. Two siblings with neonatal pemphigus vulgaris associated with mild maternal disease. *Br J Dermatol* 2007;**157**:192-4.

Vojtechová M, Turecková J, Kucerová D, et al. Regulation of mTORC1 signaling by Src kinase activity is Akt1-independent in RSV- transformed cells. *Neoplasia* 2008;**10**: 99-107.

Wang X, Brégégère F, Frusic-Zlotkin M, et al. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. *Apoptosis* 2004;**9**: 131-43.

Waschke J, Bruggeman P, Baugartner W, et al. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest* 2005;**115**:3157-65.

Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* 2008;**130**: 21-54.

- Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, et al. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;**276**:41175-81.
- Wilgram GF, Caulfield JB and Lever WF An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 1961;**36**:373-82.
- Williamson L, Reess NA, Candelari A et al. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key supresor of c-Myc in the skin. *Embo J*. 2006;**25**: 3298-309.
- Williamson L, Hunziker T, Suter MM et al. Nuclear c-Myc: a molecular marker for early stage pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2006;**127**:1549-55.
- Wool S, Windoffer R, Leube RE. p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoeskeleton in cultured cells. *J Cell Biol* 2007;**177**:795-807.
- Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001;**61**:1-13.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2001;**2**:127-37.
- Yazganoglu KD, Baykal C, Kucukoglu R. Childhood pemphigus vulgaris: five cases in 16 years. *J Dermatol* 2006;**33**:846-9.
- Yu H, Jove R. The STATs of cancer – new molecular targets come of age. *Nature Rev Cancer* 2004;**4**:97-105.
- Yin T, Getsios S, Caldelari R, et al. Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2005;**280**:40355-63.
- Yokouchi M, Saleh MA, Kuroda K, et al. Pathogenic epitopes of autoantibodies in pemphigus reside in the amino-terminal adhesive region of desmogleins which are unmasked by proteolytic processing of prosequence. *J Invest Dermatol* 2009; Apr 2.
- Zillikens D, Ambach A, Zentner A et al. Evidence for cell-mediated immune mechanism in the pathology of pemphigus. *Br J Dermatol* 1993;**128**:636-43.

8. ANEXO 1

Se incluye en este Anexo el PDF del artículo publicado en la revista *Experimental Dermatology* en el que se muestran los principales hallazgos de nuestro trabajo de investigación que presentamos.

9. ANEXO 2

En este Anexo se incluye el PDF del *Viewpoint* que la revista *Experimental Dermatology* editó con motivo de la publicación de nuestro trabajo incluido en el Anexo 1.