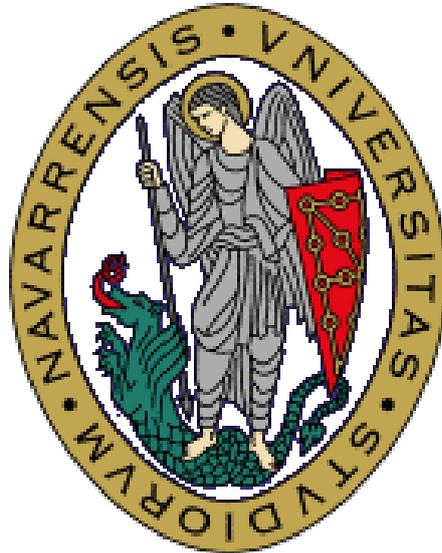


DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA
CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA



PAPEL DE LA FAK EN LA ACANTÓLISIS DEL PÉNFIGO VULGAR EN UN MODELO MURINO

Memoria presentada por Dña. María Pilar Gil
Sánchez para aspirar al grado de Doctor en Medicina
por la Universidad de Navarra.

Pamplona, Abril de 2012

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra

ISBN 978-84-8081-289-4

El presente trabajo titulado “Papel de la FAK en la acantólisis del pénfigo vulgar en un modelo murino” presentado por Doña María Pilar Gil Sánchez, 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, Abril de 2012

VºBº del Director del trabajo

Dr. Agustín España

Pamplona, Abril de 2012

VºBº del Director del trabajo

Dra. María Jesús López-Zabalza

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de la beca FIS PI081591 del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.

A mis padres, por su generosidad infinita

A mi marido y a mis hijas, por enseñarme a amar

Esta tesis ha sido posible gracias al trabajo y al apoyo de muchas personas. A todas ellas quiero expresarles mis agradecimientos.

A la Universidad de Navarra y a la Clínica Universidad de Navarra, por su formación académica y humana. Quiero agradecer especialmente a Don Esteban Santiago, mi profesor de Bioquímica, del que recuerdo sus clases con gran entusiasmo y cierta nostalgia; y que casi veinticinco años más tarde nos ha ayudado en la publicación de este trabajo. Doy las gracias a las personas que trabajan en la Clínica y cada día me saludan con una sonrisa y a los pacientes que a lo largo de mi vida profesional he conocido porque al confiar en mí sus preocupaciones me han enseñado el valor de la vida.

A mi director de tesis, el Dr. Agustín España, un trabajador incansable y entusiasta, por su tiempo, paciencia y dedicación.

A mi co-directora de tesis, la Dra. María Jesús López-Zabalza, una mujer de ejemplo a seguir tanto en lo humano como en lo profesional, por su rigor científico, disponibilidad y cercanía.

A todas las personas que han pasado y están en el Departamento de Dermatología, con las que he compartido gran parte de mi vida con alegría, que me han apoyado, animado y facilitado la realización de este trabajo. Agradezco a Pilarcho García, María Dolores Amezcua, Beatriz Armendáriz, Soledad Solchaga, Carmen Elarre, Marina Sanz, Gloria Soriano, Socorro Santos, Teresa García e Inés Garralda que han sido y son el alma del Departamento. Agradezco a los doctores Emilio Quintanilla, Javier Vázquez, Agustín España y Pedro Redondo el haber sido mis maestros. Gracias a mis compañeros, María Eugenia Iglesias, Javier Vicente, Iñigo de Felipe, Ignacio Sánchez-Carpintero, Teresa Solano, Ana Bauzá, Pedro Llorret, Marta Fernández, Miguel Montalbetti, Alejandro Sierra, Julio del Olmo, Miren Marquina, Mainer Pretel, Leyre Aguado, Gorka Ruiz-Carrillo, Laura Marqués, María Navedo, Ana Giménez, Isabel Irrázaval, Miguel Lera con los que he podido compartir muy buenos momentos. Gracias a las secretarías de Dermatología, en especial a Estibaliz Galdeano y Cristina Salinas.

A las personas del laboratorio de Bioquímica que me han hecho sentirme como en mi propio departamento: Mari José, Adela, Beatriz, Silvia, Marina, Antonia, María, Sara y en especial a la Doctora Teresa Módol, por todo lo que me ha ayudado, enseñando y animado a lo largo de tres años.

A las personas del animalario, en especial a Juan Percaz que puntualmente nos preparaba los ratones, a las personas del laboratorio de proteómica del CIMA, en especial a Mari Mora por su serena paciencia, a las que trabajan en la Unidad de Morfología e Imagen del CIMA, a Virginia Sobrini por su buena gestión de los temas burocráticos.

A toda mi familia por el apoyo y cariño brindado.

A mis amigos por los ánimos y momentos compartidos con todos y en especial a Nuria García.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Ac	anticuerpos
Ach	<i>Acetylcholine</i>
AChR	<i>acetylcholine receptor</i>
ag	antígeno
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
Akt/PKB	protein Kinase B
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
AR	<i>anfirregulin</i>
ARC	<i>apoptosis repressor with a CARD</i>
ATPase	<i>adenosine triphosphatase</i>
Bad	<i>Bcl-2 associated death promotor</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 antagonist x</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2 protein</i>
BH	<i>Bcl homology Bcl-2</i>
BP180	<i>Bullous pemphigoid antigen 180</i>
BP230	<i>Bullous pemphigoid antigen 230</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BTC	<i>betacellulin</i>
CAD	<i>caspase-activated Dnase</i>
CARD	<i>caspase recruiment domain</i>
CASPASAS	<i>cisteine-aspartate proteases específicas</i>
c-JUN/AP-1	<i>v-jun avian sarcomavirus 17 oncogene homolog</i>
CL	inhibidor de isoformas HER
CK	<i>creatin kinase</i>
c-Myc	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
cols.	colaboradores
DISC	<i>Death inducing signalling complex</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	desmoplaquina
Dsc	desmocolina
Dsg 1	desmogleína 1
Dsg 3	desmogleína 3
EC	extracelulares (dominios)
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPR	<i>epirregulin</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>

FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FasR	<i>Fas-receptor</i>
FAT	<i>focal adhesion targeting</i>
FERM	<i>band 4.1, ezrin, radixin, moesin</i>
FERM	<i>proteín4.1, erizin, radixin, moesin homology</i>
FIn	<i>filamentos intermedios</i>
FI	<i>Inhibidor de FAK</i>
FKBP-12	<i>FK-506 binding protein 12</i>
FKHRL-1	<i>Forkhead (drosophila) homolog (rhabdomyosarcoma)like 1</i>
Flice	<i>FADD-like Interleucyn 1 beta converting enzyme</i>
FLIP	<i>FADD-like ICE inhibitory protein</i>
g	<i>gram (s)</i>
GAP	<i>GTPasa activating protein</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HB-EGF	<i>heparin binding epidermal growth factor-like</i>
HE	<i>hematoxilina-eosina</i>
HER	<i>human epidermal receptor / human EGFR related</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
ICAD	<i>inhibitor of caspase-activated DNase</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFD	<i>inmunofluorescencia directa</i>
IFI	<i>inmunofluorescencia indirecta</i>
IgA	<i>immunoglobulin A</i>
IgE	<i>immunoglobulin E</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	<i>immunoglobulin G</i>
IgG-PV	<i>inmunoglobulina G de paciente con PV</i>
IgG-SN	<i>inmunoglobulina G de paciente control</i>
IL	<i>interleukin</i>
JAKs	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
M	<i>molar</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
mb	<i>membrana plasmática</i>
MBL	<i>mannan-binding lectin</i>
MEKK1	<i>mitogen-activated protein Kinase Kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAD	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>reduced NAD</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NOS	<i>NO synthase</i>

NRG	neurorregulinas
p	<i>probability</i>
P	<i>phosphate</i>
p200	autoantígeno de 200 kDa
p38MAPK	<i>protein 38 matrix adhesion protein kinase</i>
PA	plasminógeno
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCI	inhibidor de caspasas
PERK	<i>protein endoplasmic reticulum kinase</i>
PERP	<i>p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>
PF	pénfigo foliáceo
PF-573,228	Inhibidor de FAK (FI)
PG	placoglobina
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3'-kinase</i>
PIP2	<i>fosfatidilinositol 4,5-bifosfato</i>
PIP3	<i>fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC	<i>phospholipase C</i>
PMP	<i>peripheral myelin protein</i>
pNA	p-nitroanilina
PP1	inhibidor de Src
PV	pénfigo vulgar
PX	penfaxina
Rheb	Familia Ras de GTPasa
RP	rapamicina
<i>raptor</i>	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
<i>riCTOR</i>	<i>rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDs-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGKS	<i>Glucorticoids induced protein kinase</i>
SH2	dominio 2 de homología Src
SIE	sustancia intercelular epidérmica
SN	suero normal (paciente control)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Src	producto del gen transformante del virus de sarcoma de Rous
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>triethanolamine-buffered saline</i>
TBS/Tw	<i>triethanolamine-buffered saline/tween</i>
TE	tampón Tris/EDTA
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	<i>tyrosin kinase</i>
TLC	<i>thin-layer chromatography</i>

TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Treg	<i>regulatory T cell</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis protein 1</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis protein 2</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i>
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
Y	<i>tirosina</i>

ÍNDICE

<u>2. 2. ELISA</u>	68
<u>2. 3. Inmuprecipitación</u>	68
3. Purificación de IgG.....	71
4. Modelo de experimentación animal.....	72
5. Experimentos de transferencia pasiva.....	73
6. Administración de inhibidores.....	74
<u>6. 1. PF-573,228</u>	75
<u>6. 2. PP1</u>	75
<u>6. 3. Rapamicina</u>	75
<u>6. 4. CL-387,785</u>	75
<u>6. 5. PCI</u>	76
7. Hematoxilina-eosina.....	76
8. Inmunohistoquímica.....	77
9. Técnica TUNEL.....	79
10. Medida de la actividad enzimática de Caspasas-3 y -9.....	79
11. Preparación de los lisados celulares y análisis mediante Western blot...	80
12. Análisis estadístico.....	82
IV.- RESULTADOS	83
1. Test de patogenicidad de las fracciones IgG de los sueros de los pacientes en los ratones C57	85
<u>1. 1. Administración de fracciones IgG de suero control</u>	85
<u>1. 2. Administración de fracciones IgG de suero de pacientes con PV</u>	85
2. Estudio de la expresión de la FAK en su forma fosforilada en los residuos tirosina 397 y 925 en las lesiones de PV en los ratones tratados con fracciones de PV- IgG	86
3. Estudio de la inhibición de la acantólisis suprabasal de la epidermis y de la apoptosis, mediante técnica TUNEL, en los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV	87
4. El pretratamiento con inhibidores de Src, mTOR, isoformas HER y caspasas e inyección posterior de fracciones de PV-IgG disminuye la expresión de FAK fosforilada en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de la epidermis.	88

<u>4. 1. Pretratamiento con PP1 e inyección de fracciones de IgG-PV....</u>	88
<u>4. 2. Pretratamiento con rapamicina e inyección de fracciones de IgG-PV.....</u>	89
<u>4. 3. Pretratamiento con CL e inyección de fracciones de IgG-PV</u>	90
<u>4. 4. Pretratamiento con inhibidor de caspasas e inyección de fracciones de IgG-PV</u>	90
5. Inhibición de marcadores de apoptosis en las células basales de la epidermis en los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV	91
6. Inhibición de marcadores de apoptosis en las células basales de la epidermis en los ratones pretratados con inhibidores de Src, mTOR e isosformas HER previo a la inyección de fracciones de IgG-PV.....	93
<u>6. 1. Pretratamiento con PP1 e inyección de fracciones de IgG-PV... ..</u>	93
<u>6. 2. Pretratamiento con rapamicina e inyección de fracciones de IgG-PV.....</u>	94
<u>6. 3. Pretratamiento con CL e inyección de fracciones de IgG-PV ..</u>	95
7. Los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV muestran una disminución de la expresión de niveles de P-mTOR y P-Src en las células basales de la epidermis	97
V.- DISCUSIÓN.....	115
1. Experimentos de transferencia pasiva del pénfigo vulgar en un modelo murino.....	120
2. Hallazgos de los experimentos llevados a cabo en los ratones.....	123
VI.- CONCLUSIONES.....	135
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	139
VIII.- ANEXO 1.....	167

I.- INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades ampollosas cutáneas

Las enfermedades ampollosas cutáneas se pueden clasificar según múltiples criterios. Díaz y Giudice (Díaz and Giudice, 2000) las dividen en dos grandes grupos: las debidas a trastornos genéticos o genodermatosis y las de origen autoinmune. Éstas se caracterizan por la producción de autoanticuerpos circulantes, fundamentalmente de inmunoglobulina G (IgG), dirigidos frente a distintos antígenos de las uniones intercelulares o de la unión dermo-epidérmica. Las genodermatosis suelen manifestarse en el nacimiento o durante el periodo neonatal, mientras que las autoinmunes en cualquier etapa de la vida. Cada uno de estos grupos se subclasifica a su vez, dependiendo del plano de localización de la ampolla, en intraepidérmicas y subepidérmicas (**Tabla 1**).

ENFERMEDAD	ANTÍGENO
<u>Intraepidérmica</u>	
Superficial	
Pénfigo foliáceo	Dsg 1
Pénfigo eritematoso	Dsg 1
Pénfigo foliáceo endémico o Fogo Selvagem	Dsg 1
Profundo:	
Pénfigo vulgar	Dsg 3 o Dsg 3+Dsg 1
Pénfigo vegetante	Dsg 3+Dsg 1
Pénfigo paraneoplásico	Plaquinas
<u>Subepidérmica</u>	
-Penfigoide ampolloso	BP180 o BP180+BP230
-Penfigoide anti-p200	Laminina y 1 (Dainichi et al, 2010)
-Penfigoide <i>gestationis</i>	BP180 o BP180+BP230
-Penfigoide de mucosas	BP180, laminina 5 (lamina 322), integrina $\alpha6\beta4$
-Dermatitis herpetiforme	Desconocido (transglutaminasa)
-Enfermedad IgA lineal	Antígeno 97 kDa

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

2. Pénfigo vulgar

2.1. Definición

Se han descrito diferentes tipos de pénfigo. Todos ellos pertenecen al grupo de enfermedades ampollosas autoinmunes adquiridas. En estas enfermedades existen autoanticuerpos circulantes que cuando se unen al antígeno diana provocan la activación de mecanismos no del todo conocidos, que inducen la ruptura de los desmosomas y la separación de los queratinocitos. Esta separación celular se denomina histopatológicamente acantólisis. Todo este proceso se manifiesta clínicamente en los pacientes con la aparición de ampollas/erosiones en piel y/o mucosas.

El pénfigo se clasifica según la localización de la ampolla dentro de la epidermis en dos grandes grupos: el pénfigo superficial y el pénfigo profundo, que incluye el pénfigo vulgar (PV) (**Tabla 1**). En las formas superficiales la acantólisis se origina en la capa granulosa de la epidermis y en las formas profundas se localiza en la zona suprabasal.

Dentro del PV, a su vez, se han definido dos subtipos: la forma mucosa y la forma cutáneo-mucosa, dependiendo de la localización y del número de lesiones. Se considera que un paciente tiene un PV mucoso si presenta lesiones principalmente en mucosa oral y una afectación limitada en la piel (no más de 5-6 lesiones costrosas, erosiones o ampollas con diámetro inferior a 5 centímetros). Si el paciente, además de lesiones en mucosa oral, tiene en piel más de 6 lesiones y el diámetro de éstas es mayor de 5 centímetros es considerado del subtipo cutáneo-mucoso. Característicamente, los pacientes con PV mucoso presentan anticuerpos (Ac) dirigidos frente a la desmogleína (Dsg) 1, mientras que los que presentan la forma cutáneo-mucosa desarrollan Ac frente a la Dsg 1 y 3. Cada una de estas formas tiene un pronóstico y un tratamiento distinto (Amagai et al, 1999 (a), (b)).

2.2. Epidemiología

2.2.1. Incidencia

La incidencia del PV es baja (1 a 5 casos por millón de habitantes/año) y variable en función de la población estudiada (Joly et al, 2011). Es mucho más frecuente en la población de origen judío y en japoneses. En Jerusalén se estima que su incidencia es de 16

a 32 casos por cada millón de habitantes (Pisanti et al, 1974; Bastuji-Garin et al, 1995). En países donde este grupo racial es porcentualmente pequeño como en Finlandia su incidencia no supera los 0,76 casos por millón de habitantes (Hietanen et al, 1982). No existen claramente diferencias entre sexos, aunque en algunos estudios se ha descrito un mayor predominio en mujeres (1,5:1) (Tanikawa et al, 2011). La edad de comienzo se 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).

2.2.2. 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. Entre los judíos askenazi con PV predomina el HLA-DR4 (Ahmed et al, 1990). En un estudio reciente en caucásicos e indoasiáticos se ha confirmado la asociación con los alelos HLA DRβ1*0402, DRβ1*1404, DQβ1*0302 y DQβ1*0503 (Saha et al, 2010); además se ha descrito un nuevo alelo DRβ1*1454. Entre la población japonesa los HLA asociados a la susceptibilidad de desarrollar PV se encuentran DRβ1*0406, DRβ1*1401, DRβ1*1405 y DRβ1*1406 (Yamamoto et al, 2011).

En un estudio español basado en 26 pacientes afectos de PV se observó la presencia de HLA-DR4 en 23 de ellos. De éstos, el 81% presentaba el alelo DRβ1*0402, frente a sólo un 4% de la población general (González-Escribano et al, 1998). Otro trabajo español más reciente, basado en el estudio de varias familias diagnosticadas de PV familiar, mostró que en todos los casos estaba presente el haplotipo HLA DRβ1*0402 y DRβ1*1404, incluidos también familiares no afectos de enfermedad (Bordel-Gómez et al, 2006).

Parece que también existen alelos protectores como DQβ1*02, DRβ1*0301, DRβ1*07 y DQα1*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-Dsg 1 (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 realmente bajo (Stavropoulus et al, 2001).

Estudios recientes describen 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 condicionado genéticamente.

-Citocinas

En un trabajo publicado en el 2005 se encontró una mayor frecuencia del haplotipo *low producer* de 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). El gen que codifica la Dsg 3 contiene 46 SNPs. En un estudio publicado se muestra una asociación entre 2 SNP y el PV (Capon et al, 2006) y curiosamente estos 2 SNPs se encuentran en el contexto de alelos de HLA conocidos por conferir susceptibilidad para desarrollar el PV. Consecuentemente se postula el efecto aditivo de los dos *loci*.

2.2.3. Otros factores

La radiación ultravioleta B (Reis et al, 2000), la radiación ionizante (Aguado et al, 2009), el estrés (Cremniter et al, 1998) y la ingesta de determinados fármacos como la penicilamina, penicilina (Heymann et al, 2007), captopril y β -bloqueantes han sido implicados como posibles factores etiopatogénicos en el PV. 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) sin poder confirmar si esta asociación es casual o si es realmente inductora de la enfermedad. También se ha planteado la posibilidad de que superantígenos como el de la *Candida* o del estreptococo *pyogenes* o estafilococo provoquen activación policlonal de células T implicándose así en la patogenia del PV (Dar et al, 2011).

En un trabajo recientemente publicado se estudia la presencia de otros autoanticuerpos en el PV además de los anti-Dsg 1 y anti-Dsg 3. Se observa una elevación significativa de Ac anticardiolipina IgM, anti-reticulina IgG y anti-gliadina IgG (Mejri et al, 2011). Esto apoya la hipótesis de que la respuesta autoinmune humoral que se da en el PV está en el contexto de otra general, consecuencia de una disregulación inmunológica.

2.3. Etiopatogenia

Aunque no está totalmente aclarado el mecanismo por el que se produce la acantólisis suprabasal, son muchos los descubrimientos que se han producido en los últimos años. Así se han implicado diferentes procesos en la etiopatogenia del PV, entre los que destacan: producción de autoanticuerpos que se unen a diferentes antígenos (Dsg 3, receptores de acetil-colina, etc); mecanismos potenciadores de la respuesta inflamatoria (proteasas, sistemas de complemento, etc) que favorecen la acantólisis; participación de varias vías de señalización intracelular y activación de diferentes moléculas señalizadoras (EGFR, PI3K, Src, mTOR, FasL, etc) que intervienen de forma activa en la inducción de la acantólisis; cambios en el citoesqueleto y activación de caspasas.

Para comprender los mecanismos que intervienen en la etiopatogenia del PV antes expondremos la estructura de la piel, los diferentes tipos de uniones intercelulares y la función que tienen éstas en el mantenimiento de la cohesión epidérmica en condiciones normales.

2.3.1. Estructura de la piel

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 ascienden para ser eliminadas en la capa más superficial una vez queratinizadas.

Las capas de la epidermis de la más interna a la externa son: basal, espinosa, granulosa, estrato lúcido (presente únicamente en palmas y plantas) y córnea. Las dos primeras corresponden a la epidermis metabólicamente activa (cuerpo mucoso de Malpighio) y las otras tres corresponden a la 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 está formada por cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel (estas dos últimas en un porcentaje bajo).

2.3.2. Uniones intercelulares en la epidermis

La epidermis, como todos los tejidos vivos, presenta estructuras especializadas que permiten una correcta unión entre células favoreciendo la comunicación intercelular. Estas uniones celulares son principalmente de tres tipos: las de anclaje, dentro de las cuales están las uniones adherentes, las focales, los desmosomas (*maculae adherens*) y los hemidesmosomas; las ocluyentes (*tight junctions*) y las de comunicación (uniones *gap* o uniones de contacto). No expondremos las uniones ocluyentes al estar poco desarrolladas en la epidermis ni las uniones *gap* ya que no tienen bien definida su función en la epidermis.

Las uniones de anclaje permiten fijar células entre sí y a la matriz extracelular. Básicamente constan de proteínas transmembrana que se extienden a través de la membrana plasmática uniendo filamentos citoplasmáticos de una célula con otra. Así, básicamente se admite que las uniones adherentes y las focales conectan a filamentos de

actina mientras que los desmosomas y los hemidesmosomas lo hacen a los filamentos intermedios (FIn).

-Desmosomas

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, aumentando en número y tamaño cuando los queratinocitos van migrando hacia estratos más superficiales. Unen los FIn de queratina del citoesqueleto a la membrana celular para mantener la integridad de la célula. Los desmosomas son uniones calcio-dependientes, observándose en cultivos de queratinocitos en condiciones de hipocalcemia una disrupción en su organización.

Desde el punto de vista ultraestructural, están formados por dos placas electrondensas 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 FIn 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 resistencia mecánica.



Desmoglea:

- *Desmogleína 1
- *Desmogleína 2
- *Desmogleína 3
- *Desmogleína 4
- *Desmocolina 1a y 1b
- *Desmocolina 2a y 2b
- *Desmocolina 3a y 3b

Placas intracelulares:

- *Placoglobina
- *Desmoplaquina 1
- *Desmoplaquina 2
- *Desmocalmina
- *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 flecha la desmoglea

Los desmosomas, desde el punto de vista estructural, están constituidos básicamente por dos tipos de proteínas (**Figura 2**). El primer tipo corresponde a proteínas transmembrana que están formadas por tres dominios (extracelular, transmembrana e intracitoplasmático). El segundo tipo son proteínas intracitoplasmáticas. Ambos tipos de proteínas están en íntima conexión.

Las proteínas transmembrana se denominan caderinas y precisan calcio para realizar su función de adhesión. Dentro de las caderinas se distinguen: las proteínas constitutivas de las uniones adherentes o las clásicas (E-caderinas) y las desmosómicas. 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 y una adicional en su región carboxiterminal. Se dividen en dos tipos: desmogleínas y desmocollinas (Dsc).

Existen cuatro isoformas de Dsg, cuyos genes se localizan en el cromosoma humano 18q12 (Simrak et al, 1995). Cada una tiene un peso molecular diferente: 160 kDa la Dsg 1, 130 kDa la Dsg 3 y 107,8 kDa la Dsg 4 (Nagasaka et al, 2004). La Dsg 1 y la Dsg 3 se encuentran casi exclusivamente en los epitelios estratificados y la Dsg 4 en la matriz del pelo y en la capas suprabasales de la epidermis (Mahoney et al, 2006). La Dsg 2 tiene una expresión más difusa, apareciendo en todos los tejidos que tienen desmosomas, incluido el miocardio (Schafer et al, 1994).

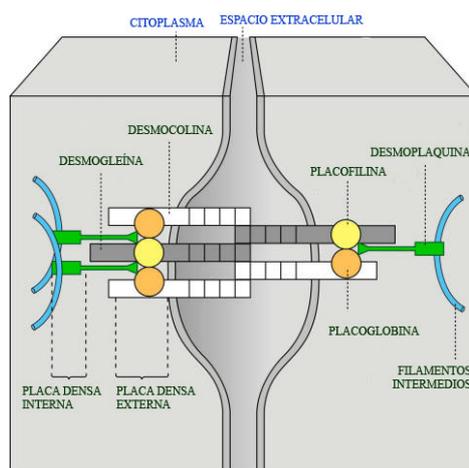


Figura 2. Estructura del desmosoma. Se observa la interrelación de las distintas proteínas constitutivas de los desmosomas

La distribución de los distintos subtipos de Dsg no es uniforme en todo el espesor de la epidermis. La Dsg 1 se expresa de forma creciente según va madurando el queratinocito, siendo mayor en las capas superiores de la epidermis. Por el contrario, la Dsg 3 tiene una expresión mayor en los estratos inferiores, siendo casi indetectable en los superiores (Iwatsuki et al, 1995) (**Figura 3**).

En las mucosas, curiosamente la Dsg 1 se expresa con una distribución similar a la de la piel pero resultando casi inapreciable en estratos inferiores y la Dsg 3 lo hace en todo el espesor de la mucosa, aunque es mayor en las capas inferiores (Shirakata et al, 1998; Amagai et al, 1996) (**Figura 3**).

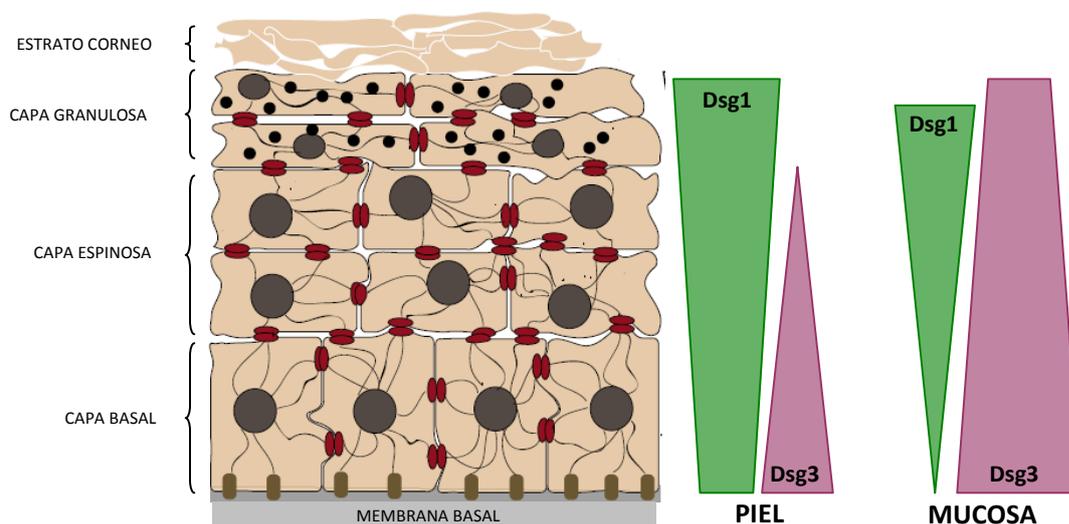


Figura 3. Distribución de las desmogleínas en piel y mucosas

Existe una variabilidad de expresión de Dsg según la región anatómica. La cantidad de Dsg 3 es mayor en zonas del cuero cabelludo y mucosa oral y la de Dsg 1 mayor en región facial y tronco superior y en muy poca cantidad en mucosa oral. La Dsg 4 se expresa en áreas donde hay una alta densidad de folículos pilosebáceos (Fujii et al, 2011).

Otra caderina desmosómica es la Dsc, que es muy semejante a la Dsg. Existen tres isoformas. La Dsc 1 suele estar en los estratos más superficiales y maduros de la epidermis, la Dsc 2 en estratos intermedios y la Dsc 3 en 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 superficiales. La Dsg y la Dsc se unen a epítopes diferentes de la PG en un mismo desmosoma y en distinta proporción. Mientras que una molécula de Dsg se une a seis de PG, la Dsc se une únicamente a una (Kowalczyk et al, 1996). Pero, se ha observado que ratones *knockout* 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 FIn de queratina al desmosoma (**Figura 2**). Se expresa en la totalidad de la epidermis, pero en mayor cantidad en estratos profundos y no son exclusivas de los epitelios (Arnemann et al, 1993). Existen dos isoformas: la DP I y la DP II. La porción aminoterminal de la DP interacciona con la placa desmosómica, probablemente a través de la PG, de forma directa o por proteínas desconocidas.

Existen otras proteínas constituyentes de la placa desmosómica, que unen el desmosoma a los FIn como placofilina (Smith et al, 1998), desmocalmina y plectina.

-Uniones adherentes

Las uniones adherentes están constituidas básicamente por caderinas clásicas (E-caderina y P-caderina), que al igual que las de los desmosomas tienen una porción extracelular y otra intracelular. Además tienen una proteína en común con los desmosomas que es la PG y otras específicas que son las cateninas. Es importante recordar que éstas sirven de anclaje a las fibras de α -actina. Los filamentos de actina que conectan con otras estructuras intervienen en la motilidad celular, en los cambios de forma y en la transducción de señales entre la membrana y el núcleo. Además, las uniones adherentes tienen un papel primordial en el control de la estratificación de la epidermis, facilitando posteriormente un ensamblaje adecuado de los desmosomas.

-Uniones focales

Las uniones focales permiten un enlace dinámico entre la actina del citoesqueleto y las proteínas de la matriz extracelular. Presentan como proteína transmembrana la

integrina, que pertenece a la familia de las moléculas de adhesión y se compone de dos subunidades contiguas y diferentes (heterodímeros) α y β . El lugar de unión al ligando está formado por ambas cadenas y necesita la presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} . Los dominios extracelulares de éstas se unen a las fibras de colágeno a través de una proteína adhesiva como la fibronectina o laminina. Por sus dominios citosólicos se unen a los filamentos de actina a través de un conjunto de proteínas adaptadoras como la talina, vinculina, paxilina y α -actinina. Estas uniones reclutan proteínas tirosina quinasa como la FAK (*focal adhesion kinase*) cuya función expondremos más adelante.

2.3.3. Antígenos del PV. El papel patogénico de los anticuerpos IgG y de la inmunidad celular

Alrededor de 50 antígenos órgano-específicos y no órgano-específicos pueden ser dianas en el PV, incluyendo las caderinas desmosómicas, otras moléculas de adhesión, receptores colinérgicos y otros receptores de membrana como el PERP, PMP así como proteínas mitocondriales (Grando et al, 2012). Los anticuerpos dirigidos frente a distintos antígenos inducen la acantólisis bien por un efecto directo como consecuencia de su unión a la molécula diana o bien por poner en marcha diferentes vías de señalización intracelular como expondré en el siguiente apartado (Sitaru et al, 2005).

-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 y cols. identificaron dos bandas principales de 130 y 80 kDa 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 y cols. identificaron una banda de 85 kDa que correspondía a la PG y observaron que la IgG-PV no se unía directamente a esta proteína, quedando como único antígeno diana la proteína de 130 kDa (Korman et al, 1989). Amagai y cols., mediante *immunoscreening* con IgG-PV purificada, identificaron la proteína de 130 kDa como una nueva Dsg, llamada Dsg 3 (Amagai et al, 1991).

Mediante el uso de proteínas de fusión que representaban distintas porciones de los dominios extracelulares de la Dsg 3 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). 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 se ha sugerido que estas regiones de la Dsg 3 guardan un papel más relevante en la adhesión entre los queratinocitos (Müller et al, 2008).

En 1994 Amagai y cols. produjeron una nueva serie de proteínas de fusión con Dsg 3, esta vez con una porción de IgG humana expresada mediante un baculovirus en células de insecto Sf9 (Amagai et al, 1994). La absorción de la porción extracelular de los Ac anti-Dsg 3 eliminaba la mayor parte de la actividad patogénica del suero del PV, reseñando la importancia de los anti-Dsg 3 en la patogenia del PV.

Por otra parte, usando ratones *knockout* para la Dsg 3 y Dsg 3 recombinante como antígeno, se vio que estos ratones desarrollaban anticuerpos anti-Dsg 3 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 Dsg 3 inmunizados fueron transferidos a ratones Dsg 3^{+/+} Rag 2^{-/-} (ratones inmunodeficientes). Los ratones huéspedes, como se esperaba, desarrollaron el fenotipo del PV. Se hizo obvio que los anticuerpos anti-Dsg 3 podrían tener como diana distintos epítopes en el dominio N-terminal de la molécula y que algunos de esos anticuerpos anti-Dsg 3 no eran patogénicos.

Cuando los esplenocitos de los ratones Rag 2^{-/-} inmunizados con Dsg 3-hibridomas fueron usados para producir anti-Dsg 3 fue posible aislar los clones específicos que producían anticuerpos patogénicos que reaccionaban con la porción EC1 de la Dsg 3 (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-Dsg 3 patogénicos y no patogénicos.

En un estudio publicado recientemente se ha conseguido desarrollar un nuevo sistema experimental para evaluar la patogenicidad *in vivo* de los clones individuales de linfocitos T Dsg 3-reactivos (Takahashi et al, 2008). En este sistema, las líneas de linfocitos T Dsg 3 reactivas generadas *in vitro* de ratones Dsg 3^{-/-} fueron transferidos a

ratones inmunodeficientes Rag-2^{-/-} (Dsg 3^{+/+}). Se comprobó la habilidad de inducir el fenotipo del PV después de esta transferencia. Otros estudios posteriores además de confirmar estos hallazgos han demostrado que las líneas de linfocitos T Dsg 3 también pueden producir dermatitis de interfase en el ratón (Takahashi et al, 2011).

-Antígenos no desmogleínicos en el PV

Si bien existen muchos datos a favor de que los anticuerpos anti-Dsg son suficientes para producir enfermedad, existen diferentes hallazgos que ponen en duda que la Dsg sea el único antígeno implicado en el PV. Algunos de estos datos son:

.- se puede inducir lesiones de PV en ratones *knockout* para la Dsg 3;

.- a ratones *knockout* para la Dsg 3 se les administra suero de PV desprovisto de Ac anti-Dsg 1 y desarrollan ampollas en la piel (Kalish et al, 2001);

.- títulos elevados de Ac anti-Dsg podrían ser posteriores a empeoramientos de la enfermedad en vez de ser anteriores a ella; existen individuos sanos portadores de altas cantidades de anticuerpos anti-Dsg 3 en su suero (Torzecka et al, 2003);

.- el suero de pacientes con PV contiene múltiples Ac frente a diferentes moléculas de adhesión diferentes a la Dsg como es la Dsc (Spindler et al, 2009), la PG (Korman et al, 1989), la DP (Mimouni et al, 2004), la E-cadherina y el colágeno XVII/BP180 (Schumann et al, 2000)), frente a receptores de membrana colinérgicos (Grando, 2006), a anexinas como la penfaxina (Nguyen et al, 2000 (a)), a antígenos órgano no específico como el TNF y la NADH deshidrogenasa-proteína *like* (Marchenko et al, 2010) y a antígenos órgano-específicos (Grando, 2011), como anticuerpos anti-tiroperoxidasa (Pitoia et al, 2005) y antimitocondriales (Marchenko et al, 2010).

Otra proteína frente a la cual se pueden producir anticuerpos es el Fas-R (Pan et al, 2011) y el PERP perteneciente a la familia de proteínas PMP-22, implicada en la estabilidad del desmosoma (Bektas et al, 2009).

-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 Ac purificados de pacientes con PV, reproduciendo lesiones cutáneas clínicas e

histológicamente idénticas a las observadas en pacientes con PV (Anhalt et al, 1982). Posteriormente algunos autores han observado que los autoanticuerpos IgA e IgE pueden unirse a la porción extracelular de la Dsg 3, pero su significado sigue siendo incierto (Spaeth et al, 2001). Recientemente los Ac IgM se han implicado de forma conjunta junto con los IgG dirigidos contra la Dsg 3 en la formación de ampollas (Tsunoda et al, 2011).

Otros hallazgos que ayudaron a confirmar el papel patogénico de los Ac IgG fueron la mejoría clínica de los pacientes tratados mediante plasmaféresis (Turner et al, 2000), 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 observación de la presencia transitoria de lesiones de PV en recién nacidos de madres afectas de PV (Ugajin et al, 2007), por la transferencia de IgG a través de la vía placentaria.

En el PV pueden objetivarse diferentes subclases de IgG. En la fase activa, la mayoría corresponde a IgG₄ e IgG₁ (96% y 76%, respectivamente) y en remisión a IgG₂ (75%) e IgG₄ (37,5%) (Torzecka et al, 2007). Estas últimas subclases también se observan en familiares sanos. Hay otros trabajos, algunos anteriores y otro posterior que contradicen en parte estos hallazgos. Así, se ha comprobado que la IgG₁ es la subclase predominante en pacientes con PV en remisión (Pan et al, 2011), controles sanos y familiares sanos (Bhol et al, 1995) y que la subclase más patogénica es la IgG₄ (Futei et al, 2000).

Los pacientes con PV con afectación predominante mucosa presentan Ac frente a la Dsg 3 y aquellos con afectación cutáneo-mucosa presentan además Ac frente a Dsg 1 (Amagai et al, 1999 (b)). Los Ac 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-Dsg 3 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 Ac frente a la Dsg 3 reconocen epítropes patógenos que no se reconocen de igual forma en la Dsg de la epidermis de la piel. La administración de Ac anti-Dsg 1 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 Dsg 1 y Dsg 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 Dsg 3 y en algunos casos también frente a la Dsg 1 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 Dsg 1. Esto podría explicar por qué algunos pacientes presentan lesiones únicamente en mucosa oral (Ac frente a la Dsg 3) y posteriormente desarrollan lesiones cutáneas (Ac frente a Dsg 1 y Dsg 3). Además, se ha observado que algunos pacientes sufren una variación clínica desde un PV a un PF, con un cambio en el perfil de Ac circulantes, pasando de presentar anti-Dsg 3 a presentar solamente anti-Dsg 1 (Iwatsuki et al, 1991; Kawana et al, 1994). Los pacientes que anteriormente presentaban Ac patógenos frente a Dsg 3 dejan de presentarlos y desarrollan Ac frente a Dsg 1 únicamente. Quizás, estas observaciones ponen de manifiesto la presencia de uno o varios epítropes comunes entre ambas Dgs (Salato et al, 2005).

Los títulos de IgG anti-Dsg 1 y 3 no siempre se correlacionan con la actividad de PV (Abasq et al, 2009) o no predicen la exacerbación de la enfermedad (Akman et al, 2010).

En sueros de algunos pacientes con PV se ha detectado la presencia de Ac anti-Dsc 3 mediante inmunoprecipitación (Mao et al, 2010; Müller et al, 2009)), apoyando la teoría de que éstos pueden inducir pérdida de la adhesión de los queratinocitos contribuyendo así a la formación de ampollas (Rafaei et al, 2011).

Todos estos datos expuestos ponen de manifiesto la respuesta autoinmune humoral tan variada que aparece en el PV, frente a varios antígenos, dentro de los cuales aquellos que van dirigidos frente a las Dsg 1 y 3 tendrían un papel patogénico más relevante, tal vez sobreestimado. Además, esta respuesta humoral estaría dentro de otra más general en el paciente, fruto de una disregulación inmunológica, y que se pondría de manifiesto en algunos casos por la asociación con otras enfermedades autoinmunes asociadas (Mejri et al, 2011).

-Anticuerpos frente a antígenos no demogleínicos en el PV

Los anticuerpos frente a los receptores colinérgicos, tal y como he referido previamente, se han implicado también en el PV. Se sabe que los queratinocitos humanos contienen una elaborada red no neuronal de acetilcolina para la comunicación intercelular.

Esta Ach es sintetizada, secretada y degradada por los propios queratinocitos y puede activar simultáneamente diferentes vías de señalización intracelular. Existen dos clases de receptores colinérgicos, los receptores nicotínicos y los muscarínicos (nAChR y mAChR), los cuales están implicados en la regulación de la adhesión entre células y entre célula y matriz al igual que en la migración celular (Grando, 2006).

Se ha demostrado que agonistas colinérgicos como el carbacol y la piridostigmina pueden disminuir la acantólisis en el PV *in vivo* (Nguyen et al, 2004 (a)) 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 Dsg 1, Dsg 3 y E-cadherina y los antagonistas colinérgicos producen una disociación queratinocitaria, que es paralela a la fosforilación de los desmosomas y de las caderinas clásicas (Grando, 2006).

Mediante diferentes técnicas proteómicas se ha identificado subtipos diferentes de receptores colinérgicos dianas en el PV (Kalantari et al, 2011).

Los Ac no desmogleínicos varían según el tipo de PV. Así, en un estudio se encontró Ac 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 Ac (Evangelista et al, 2006).

La detección de Ac anti-PERP se ha asociado a la depleción de Dsg 3 y a defectos de adhesión intercelular (Nguyen et al, 2009). Estudios recientes también implican a la PERP en la vía de extrínseca de la apoptosis a través de la caspasa 8 (Davies et al, 2009).

Todos estos hallazgos han mostrado conceptos alternativos acerca de la patogenicidad de Ac contra antígenos no desmogleínicos y han permitido plantear y mantener en vigencia la hipótesis “*Multiple Hit*” que implica que entre los diferentes antígenos reconocidos por el suero del PV, la Dsg 3 sería uno más y que cada uno contribuiría en parte a la pérdida de adhesión y la formación de ampollas (Grando, 2000). Pero, por otro lado se sugiere que los Ac no-Dsg no son patógenos en ausencia de los anti-Dsg (Spindler et al, 2009; Aoyama et al, 2010). Esta hipótesis también 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 (c)).

-Inmunidad celular

La regulación en la producción de Ac frente a Dsg 1 y 3 se basa en la cooperación entre linfocitos T y células B. La presencia de moléculas HLA de clase II asociadas a la enfermedad permiten la presentación de Ag de Dsg a los linfocitos T desencadenando así la respuesta inmunológica. El factor que determina quién padecerá PV y quién no es la presencia de linfocitos T reguladores (Tregs) capaces de suprimir la respuesta inmunitaria (Hertl et al, 2006). Pero una disminución de *Tregs* en sangre periférica no es suficiente para explicar la deficiencia de la actividad inmunosupresora en el PV, ya que éstos se detectan en las lesiones de PV (Arakawa et al, 2009).

Las diferencias encontradas entre las subclases de IgG en el PV pueden ser el resultado del desequilibrio existente entre linfocitos Th₁ y Th₂. y del 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. Así, la IgG₄ no sería la única isoforma de IgG patógena en el PV (Kricheli et al, 2000). No obstante, el hecho de que 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.

Algunos estudios han detectado un incremento de la actividad Th₁ respecto a Th₂ en el PV (Zillikens et al, 1993), y otros una respuesta de linfocitos Th₂ que reconocen Dsg 3 y Dsg 1, la cual sería la causante del desarrollo inicial de la enfermedad (Lin et al, 1997). Estos hallazgos pueden explicarse por la presencia de una policlonalidad de linfocitos CD4+, hecho muy factible ya que la Dsg tiene varios segmentos inmunorreactivos. Otros estudios han sugerido la participación de la inmunidad celular en el PV al detectar niveles elevados de ciertas IL entre las que se encuentra el receptor soluble de la IL-2 (rIL-2s) (Zillikens et al, 1993), la IL-15 y la IL-10 (Toto et al, 2000).

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 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⁺⁺. Estos hallazgos podrían explicar las diferencias en la síntesis de Ac entre los dos subtipos de PV, quizá como consecuencia de un procesamiento diferente de un mismo antígeno (González et al, 2000).

Estudios recientes han demostrado que las células NK CD56⁺CD3⁻ están incrementadas en los pacientes con PV activo. Además, cuando se cultivaron las células T CD4⁺ de lesiones cutáneas de pacientes con PV activo, con células NK CD56⁺CD3⁻ se detectaron 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 autoAc en el PV. Esta producción de autoAc tendría un mecanismo potenciador de las poblaciones linfocitarias, facilitado por la producción de citocinas que se secretarían desde las células a los tejidos, y que autoperpetuarían la presentación antigénica, la estimulación linfocitaria y finalmente la producción de los autoAc. Pero estos datos no los podemos separar del hecho que la autoinmunidad frente a determinados epítropes de Dsg 3 puede ser un acontecimiento normal: la presencia de células B autorreactivas se pone en evidencia al detectar Ac anti-Dsg 3 en familiares sanos de pacientes con PV (Torzecka et al, 2007).

2.3.4. Mecanismos potenciadores de la enfermedad

Aunque los autoAc 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

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. Varios estudios 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 potenciadora de la acantólisis (Mascaró et al, 1997). Así, otro dato que apoya

esta hipótesis es la detección de MBL en el espacio intercelular y en la zona de la membrana basal, y de Ficolina 2 (50%) en la zona de membrana basal (Messias et al, 2011).

-Función del sistema plasminógeno-plasmina

Algunos trabajos han mostrado que el activador del plasminógeno (uPA) y su receptor (uPAR), que puede incrementarse por la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Kitajima et al, 1999), están implicados en la acantólisis del PV (Schaefer et al, 1996; Seishima et al, 1997). Pero podría tratarse de un epifenómeno consecuencia del daño epidérmico, o ser un mecanismo amplificador de la respuesta inflamatoria, ya que no es imprescindible para que se desarrolle la enfermedad (Mahoney et al, 1999; Lanza et al, 2006).

2.5. Vías de señalización intracelulares y mecanismos moleculares

Tras la unión de los Ac con los antígenos se ponen en marcha en los queratinocitos varias vías de señalización intracelular necesarias para que se produzca la acantólisis. Revisaré conocimientos de diferentes moléculas expresadas en los queratinocitos e implicadas en estas vías.

-HER

La familia de receptores de membrana tirosina quinasa consta de 4 tipos: EGFR o HER-1 (ErbB-1), HER-2 (ErbB-2/neu), HER-3 (ErbB-3) y HER-4 (ErbB-4) (Barros et al, 2010). Son glicoproteínas transmembrana. Estructuralmente contienen un dominio extracelular que reconoce y se une a ligandos específicos, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio intracelular que contiene una actividad enzimática tirosina quinasa (TK) (**Figura 4**). El HER-3 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**).

Los receptores HER tras unirse con sus ligandos que suelen ser factores de crecimiento se activan mediante homodimerización o heterodimerización, autofosforilándose en los residuos tirosina intracitoplasmáticos. Estos eventos provocan el reclutamiento y la fosforilación de varios substratos intracelulares produciendo señales mitogénicas y activando otras vías de señalización intracelular que conllevan biosíntesis de distintas moléculas (Riese and Stern, 1998; Klapper et al, 2000; Schlessinger et al, 2000).

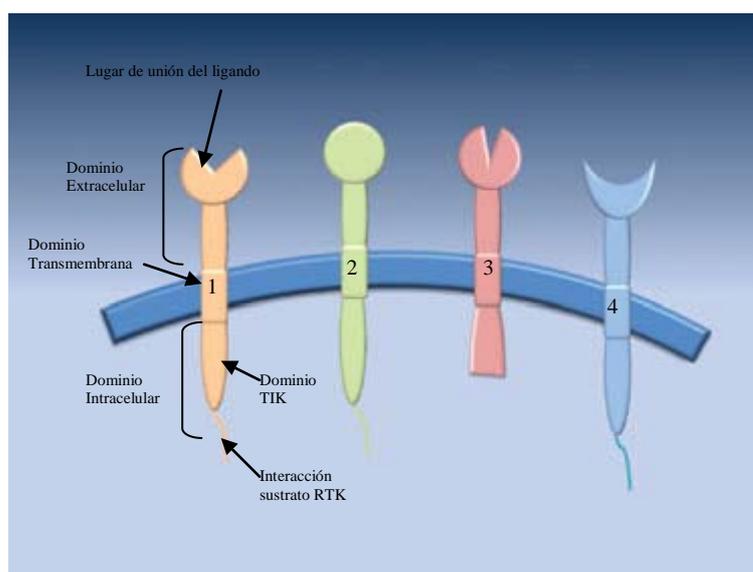


Figura 4. Esquema de los receptores de la familia HER. Su activación pondría en marcha vías de señalización intracelular y la estimulación de la maquinaria del ciclo celular (modificado de Barros et al, 2010)

Existen múltiples ligandos de receptores HER (Olayioye et al, 2000) dentro de los cuales 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 EGF, el TGF y la AR, los cuales son capaces de unir y activar a homodímeros del EGFR y a heterodímeros de éste con otros receptores de esta familia (Klapper et al, 2000). En el segundo grupo incluiríamos a las NRG, las cuales se unen a homodímeros de HER 3 o de HER 4 y a heterodímeros de estos con otros receptores de la familia (Tzahar et al, 1994). En el tercer grupo estarían la BTC, la EPR y el HB-EGF, que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de HER 4 (Jones et al, 1999), como a heterodímeros de cada uno de ellos con

otros miembros de la familia. El HER 2 es activado por EGF, TGF- α , BTC o NRGs cuando se heterodimeriza con el EGFR o HER 4 (**Figura 5**).

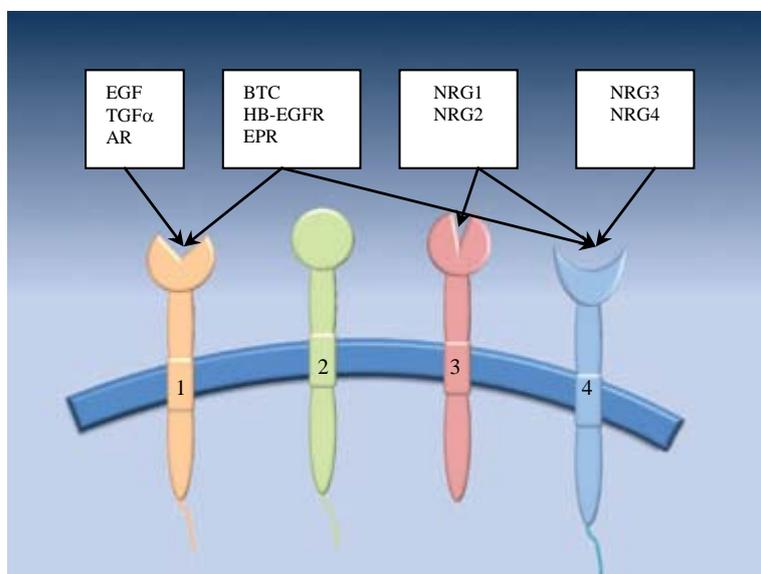


Figura 5. Imagen de los distintos ligandos y dímeros de receptor de HER a los que se unen (modificado de Barros et al, 2010). No se ha identificado hasta la fecha ningún ligando para HER 2 (Kataoka H, 2009)

Fisiológicamente, HER 1 se expresa principalmente en las células de la capa basal de la epidermis (Green et al, 1983; Holbro et al, 2004) y HER 2 en las células de la capa basal epidérmica y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Kiguchi et al, 2000). HER 3 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) y HER 4 no se expresa normalmente en la epidermis.

Las principales rutas de señalización para la familia HER, incluyendo el EGFR son: la vía *Ras-Raf-MAPK* (Alroy and Yarden, 1997), la PI3K (Muthuswamy et al, 1999) y la PLC-PKC (Marmor et al, 2004) (**Figura 6**). Otra vía de señalización adicional de estos receptores es la STATs (Yu et al, 2004). Estas vías regulan múltiples procesos biológicos, como la expresión génica, proliferación celular, angiogénesis, inhibición de la apoptosis y adhesión celular.

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). Se ha demostrado que el EGFR está implicado en la activación de vías de señalización intracelular en la acantólisis de queratinocitos en cultivo. Así se ha encontrado una ausencia de acantólisis en cultivos celulares al administrar IgG-PV junto a inhibidores del EGFR (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007 (a)). Nuestro grupo de trabajo ha publicado recientemente que la administración de IgG-PV en ratones produce una activación de las distintas isoformas de HER (EGFR, HER 2, HER 3) y que su inhibición con erlotinib (inhibidor de EGFR, HER 2, HER 3), anula por completo la enfermedad (Pretel et al, 2009).

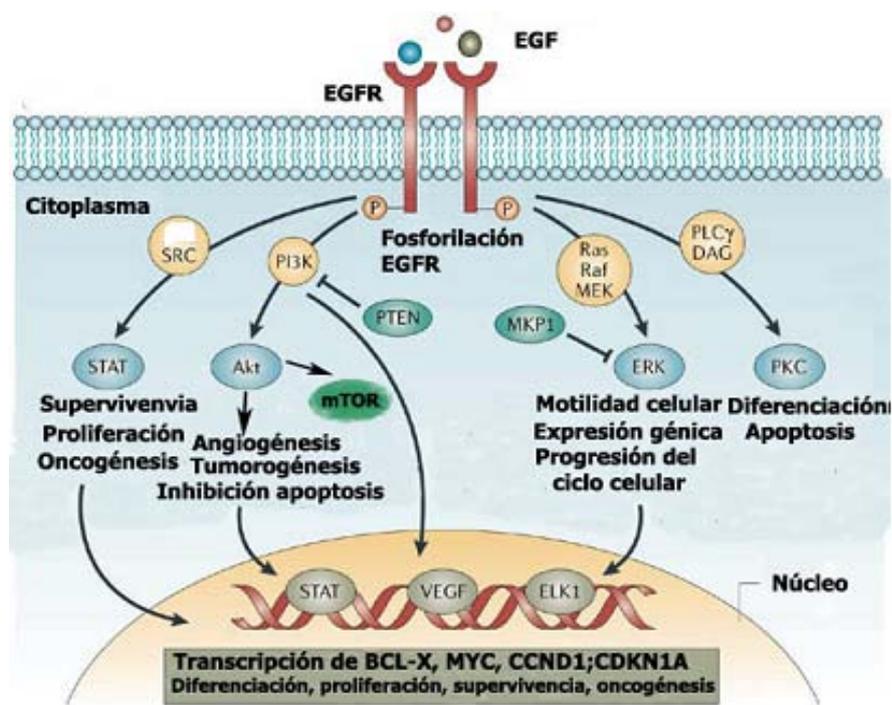


Figura 6. Esquema de las distintas vías activadas por los receptores HER (modificado de Nyati et al, 2006)

-Vía de la PLC-PKC

Es posible que esta vía de señalización intracelular esté implicada en la acantólisis del PV. La administración de la IgG-PV a 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 PKC y del activador del plasminógeno (Esaki et al, 1995). Además el quelante de Ca^{2+} intracelular libre bloquea la disociación de queratinocitos *in*

vitro y los inhibidores de la calmodulina, PLC y PKC son efectivos en bloquear la acantólisis inducida por la IgG-PV *in vivo*, tal y como ha podido demostrar nuestro grupo de trabajo (Sánchez-Carpintero et al, 2004).

-Vía de la PI3K

Se ha demostrado que en el PV existe una activación de la vía PI3K (Aoyama et al, 1999). La PI3K constituye una familia de enzimas conocida como importante reguladora de multitud de funciones celulares, tales como el crecimiento, proliferación, diferenciación, motilidad, 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 PI3K es activada por numerosos receptores transmembrana entre ellos el EGFR. Estos receptores se activan, normalmente mediante una autofosforilación, después de la unión con un ligando y reclutan la PI3K al lado citoplasmático de la membrana plasmática. La PI3K fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) y lo convierte en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual activa después a la Akt, no directamente, sino al reclutarla a la membrana plasmática donde es fosforilada (Carnero et al, 2010) **(Figura 6)**.

-Akt

La Akt/PKB (proteína quinasa B) es una familia de serina/treonina quinasas, que se regula mediante señales *upstream*, principalmente como consecuencia de la activación de la PI3K. Se expresa ampliamente en diversos tejidos y se han descrito tres isoformas: Akt 1, Akt 2 y Akt 3. Normalmente la Akt se expresa en células suprabasales y parabasales (células postmitóticas) en la epidermis de los ratones neonatos, pero no en las células basales epidérmicas (Callautti et al, 2005; O'Shaughnessy et al, 2007; Müller et al, 2008).

Desempeña un papel importante en promover la supervivencia celular en los procesos de apoptosis (Brazil et al, 2001, Kim et al, 2002 (a)) y en muchos tipos celulares como los queratinocitos (O'Shaughnessy et al, 2007). Así, la Akt activada inhibe los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, Bad (Datta et al, 1999), Bax, caspasa 9, factor de transcripción FKHL-1 (Brunnet et al, 1999) entre otros, mediante fosforilación.

Otra función de la Akt es regular el crecimiento celular a través de la activación de la mTOR (Manning et al, 2007) (**Figura 6**).

-mTOR

La mTOR es una serina/treonina quinasa de 289 kDa. Tiene un papel fundamental en el control del ciclo celular, regulando rutas de crecimiento y proliferación. Hay muchas evidencias que apoyan la hipótesis de que la mTOR es la llave de catabolismo y el anabolismo celular que determina si las células, en especial las cancerígenas, deben crecer y proliferar. Además interviene en la apoptosis y en la organización del citoesqueleto de actina.

Esta quinasa forma parte de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR (Asnaghi et al, 2004; LoPiccolo et al, 2008).

Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (mTORC1) que se define por su interacción con la proteína *raptor* (*regulatory associated protein of mTOR*) y forma un complejo con la proteína citosólica FKBP-12 y un complejo insensible a rapamicina (mTORC2) que se define por su interacción con *riCTOR* (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). Estos dos complejos de señalización junto con sus dos proteínas diferentes, establecen dos rutas de actuación de la mTOR. La ruta *raptor*-mTOR regula el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia, respondiendo a factores de crecimiento, en parte debidos a reguladores como TSC2 y TSC1 y a Rheb; la Akt fosforila al complejo mTORC1 en el residuo Ser 248 (Nave et al, 1999; Sekulic et al, 2000). En contraste, el complejo *riCTOR*-mTOR fosforila Akt y regula la reorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto y la supervivencia celular (Zhou and Huang, 2010).

Se ha visto que en algunos tipos de cáncer existe una hiperactividad de la mTOR. La vía PI3K/AKT/mTOR está activada en muchos tumores en los que está mutado el gen PTEN, por lo que los inhibidores de ésta como la rapamicina que se unen a la inmunofilina FKBP12 actuarían deteniendo el ciclo celular en la fase G₁. Como efecto contrario, otros estudios han demostrado que también puede intervenir en la apoptosis a través de vías de señalización que producen daño en los microtúbulos del citoesqueleto, mediante la fosforilación e inactivación de mediadores anti-apoptóticos como el Bcl-2. Esta apoptosis

inducida por mTOR puede ser inhibida a través de la rapamicina (Calastretti et al, 2001) y parece que sólo se consigue si previamente se anula la acción de Akt (Asnaghi et al, 2004). La rapamicina puede prevenir el daño de los queratinocitos inhibiendo la reorganización de los filamentos de actina inducida por mTOR a través de IGF-1 y la fosforilación de las proteínas de adhesión focal (Liu et al, 2008) y recuperar así la función de la actina del citoesqueleto y aumentar la expresión de la E-caderina.

La vía PI3K/Akt activada por factores de crecimiento es fundamental para la activación de la mTOR (Marmor et al, 2004), pero los resultados de nuestro grupo de trabajo (Pretel et al, 2009) sugieren una vía independiente de Akt para la fosforilación de la mTOR en las células basales de las lesiones del PV, dada la ausencia casi completa de Akt en éstas. Tal vez la presencia casi selectiva de receptores HER en la capa basal pueda explicar en parte la participación de la mTOR en el proceso de acantólisis.

-Src

La Src es una proteína tirosina quinasa soluble que juega un papel fundamental en la señalización celular. Inicialmente fue identificada como producto del gen transformante del virus del sarcoma de Rous en los pollos. 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 del EGFR (Haas et al, 2002) y que la actividad de la Src aumenta en respuesta a la señalización del EGFR (Ishizawa et al, 2004).

En múltiples neoplasias, incluyendo el cáncer de piel (Serrels et al, 2009), se ha observado un incremento de actividad de la Src. Además trabajos recientes también han mostrado la implicación de la Src en patologías que cursan con inflamación (Paul et al, 2001; Baruzzi et al, 2008). Así, la Src, al igual que otras proteínas quinasas, 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).

La Src se ha implicado en el PV, detectándose su activación en cultivos celulares a los 30 minutos de administrar IgG-PV. 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. Por otro lado 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* por lo que se podría afirmar que la Src juega un papel en la acantólisis de PV (Chernyavsky et al, 2007 (a)). Nuestro grupo de trabajo publicó que la inhibición de esta quinasa anula la enfermedad en un modelo murino (Sánchez-Carpintero et al, 2004).

Sin embargo, no todos los trabajos referidos en la literatura son igualmente concluyentes. Recientemente se ha publicado que en cultivo de queratinocitos el receptor EGFR en la superficie celular no se fosforila en el residuo Y845, lugar donde la quinasa Src actúa en este receptor, y que no se inhibe la acantólisis celular cuando al cultivo se añade inhibidor de EGFR o de Src (Heupel et al, 2009). Esto se puede explicar porque en los cultivos celulares pueden no ponerse en marcha todos los mecanismos implicados y porque tal y como nuestro grupo de trabajo publicó el papel de la Src en el PV no es fosforilar el EGFR sino que son los receptores HER los que al activarse activan a la Src (Preitel et al, 2009).

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 (Alemà 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.

-FAK (quinasa de las uniones focales)

También se conoce como PTK2 (proteína tirosina quinasa 2) y es codificada por el gen *ptk2* (cromosoma 8q24.3). Es una tirosina quinasa soluble de 125 kDa y un sustrato para la Src. Su expresión en la epidermis y en el folículo piloso del ratón presenta un patrón de membrana plasmática (Essayem et al, 2006). Se han descrito dos isoformas (α y β) y comparten más del 95% de las secuencias de aminoácidos en las diferentes especies. Tanto su extremo N-terminal FERM como C-terminal que incluye la secuencia FAT (*focal*

adhesion targeting) interacciona con muchas proteínas fundamentales para la activación de la FAK (Zhao et al, 2009) (**Figura 7**).

La FAK se activa tanto vía EGFR como vía MEC/integrinas a través de la disrupción de su autoinhibición intramolecular entre su dominio central quinasa y el dominio aminoterminal FERM (Zhao et al, 2009). La FAK activada forma un complejo binario con la familia Src quinasas vía dominio SH₂, las cuales pueden fosforilar otros sustratos y desencadenar múltiples señales intracelulares que regulan diferentes funciones celulares (**Figura 8**).

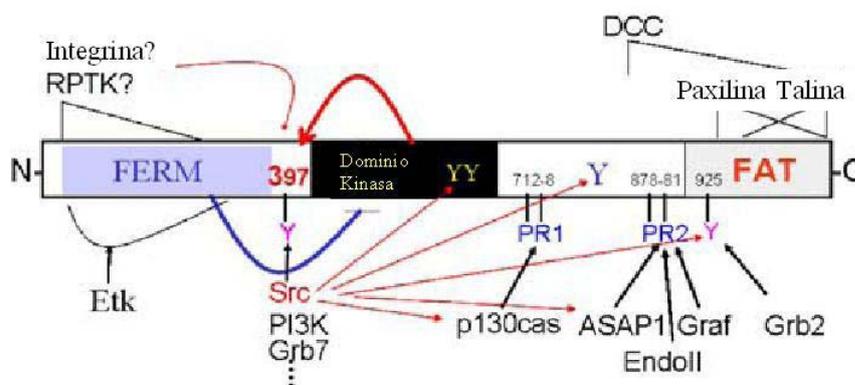


Figura 7. Estructura de FAK. Lugares de fosforilación y asociación a proteínas (modificado de Zhao et al, 2009)

Hay varios residuos de tirosina donde la FAK se puede fosforilar como son Y397, Y407, Y576, Y577, Y861 e Y925. La FAK se fosforila por la Src en todos los residuos, excepto que hasta el momento se conozca, en el Y397. Éste es el único residuo tirosina donde la FAK puede autofosforilarse (Li et al, 2008).

La FAK está implicada en los procesos de crecimiento siendo activada por PDGF, EGF, HGF, VEGF y estando relacionada con la matriz extracelular.

La adhesión celular mediada por integrinas es el principal *upstream* activador de la FAK. Ésta está acoplada a las uniones focales cuya función es unir la matriz extracelular con la actina del citoesqueleto. Participa en el remodelamiento del citoesqueleto, en el

desmontaje y formación de las estructuras de adhesión focal celular, desarrollando un papel importante en la migración y en la supervivencia celular.

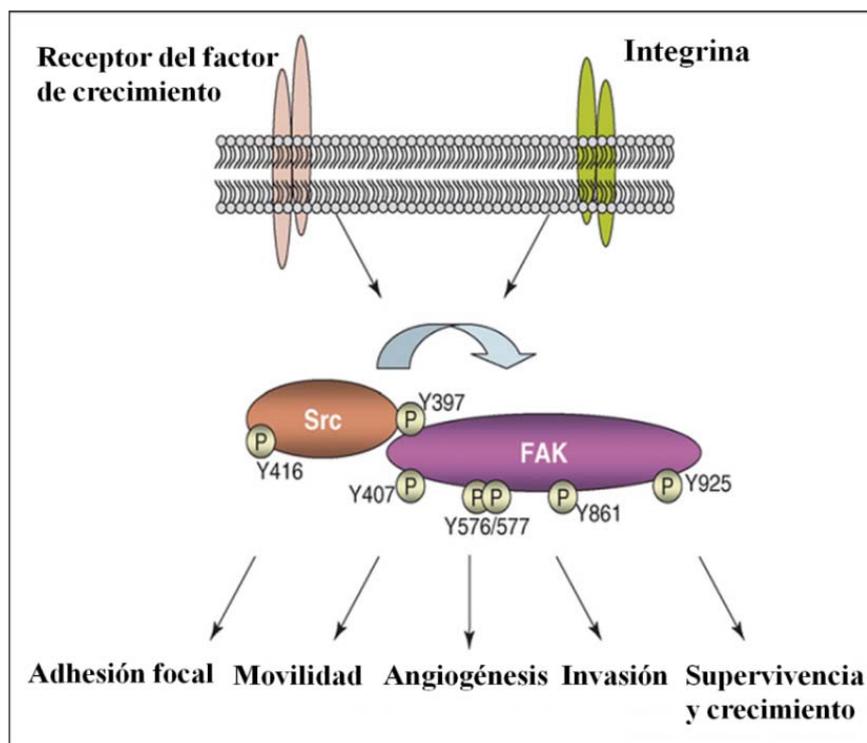


Figura 8. La FAK se activa tanto vía EGFR como vía MEC/integrinas y forma un complejo binario con la familia Src quinasa, las cuales pueden fosforilar otros sustratos y desencadenar múltiples señales intracelulares que regulen diferentes funciones celulares

En las uniones focales la FAK está adherida a la paxilina y a la talina permitiendo la unión de la vinculina y la actina del citoesqueleto a la porción citoplasmática de las integrinas. Cuando la FAK está inactiva permite la unión de la proteína Arp3 facilitando el reclutamiento del complejo Arp2/3 a las uniones focales incipientes. Pero la agrupación de integrinas, la tensión de la actina del citoesqueleto o la unión de proteínas al dominio FERM de la FAK pueden llevar a la eliminación de su autoinhibición haciendo que la FAK se autofosforile en el residuo Y397. La FAK activada conduce a la formación de complejos con la familia Src quinasa aumentando la fosforilación de FAK y de otros sustratos proteínicos dentro de las uniones focales como es la 190rhoGAP. El resultado final es que la Arp2/3 no interacciona fuertemente con la FAK activada y de esta manera puede reclutar nuevos filamentos de actina (**Figura 9**).

Además la FAK está implicada en la reorganización del citoesqueleto en procesos regulados por la mTOR (Liu et al, 2008) y en la función barrera del endotelio a través de la comunicación que establece con las caderinas y la actina del citoesqueleto (Quadri et al, 2012).

Otra función de la FAK asociada a los complejos de integrinas es impartir señales mitógenas dependientes de la activación de MAPK (Berkowitz et al, 2005).

Por otro lado se ha comprobado que la FAK está implicada en el desarrollo fenotípico agresivo de algunos tumores; muchas moléculas que inhiben esta quinasa se están desarrollando para tratamiento de neoplasias malignas.

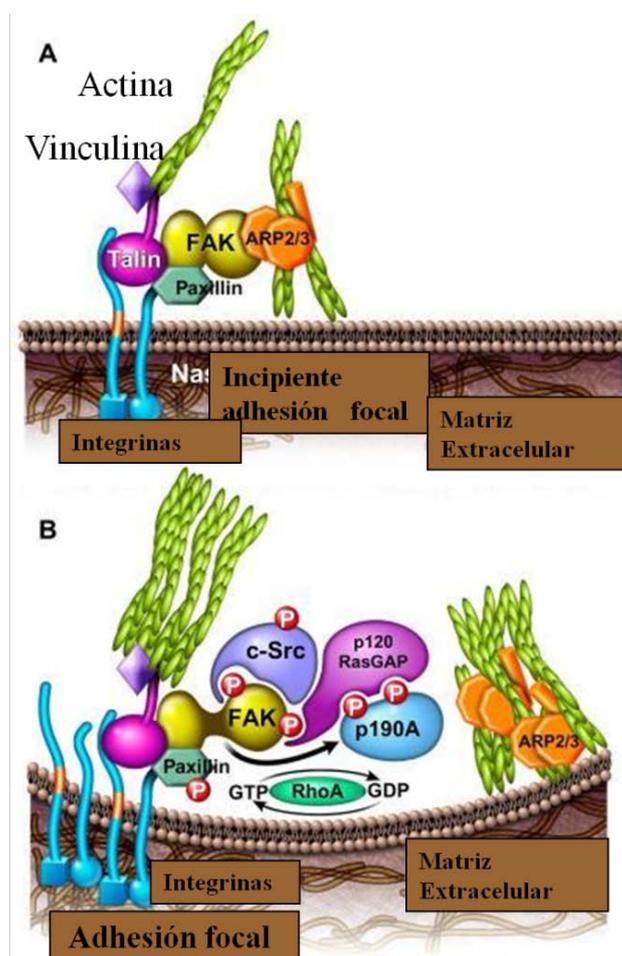


Figura 9. La FAK participa en el formación de las estructuras de adhesión focal celular y en el remodelamiento del citoesqueleto desarrollando así un papel importante en la migración y en la supervivencia celular (modificado de Tomar et al, 2009)

Actualmente se desconoce con precisión el papel que la FAK desempeña en las lesiones de PV. Los primeros trabajos que se publicaron sobre la implicación de esta quinasa en el PV comprobaron en un modelo murino una inducción de ésta (Anhalt et al, 1982). Posteriormente, Penneys detectó una sobreexpresión de la FAK en células acantolíticas de lesiones de PV y PF, mientras que en las células acantolíticas de la enfermedad de Hailey-Hailey la tinción era muy leve y en los queratinocitos espongióticos o disqueratósicos no se detectó (Penneys et al, 1996).

Se ha podido establecer un nexo de unión en la patogenia del PV entre los receptores de acetil-colina ($\alpha 9$ AchR) y la FAK. Chernyavsky y cols. han demostrado que la estimulación del $\alpha 9$ AchR regula la fosforilación de las moléculas de adhesión focal como la FAK, de citoqueratinas y de uniones intercelulares donde está presente la Dsg 3 (Chernyavsky et al, 2007 (b)). La inhibición de $\alpha 9$ AchR interfiere en la fosforilación de las proteínas de adhesión y del citoesqueleto e incluso rompe la cohesión entre las células.

-Vía MAPK

La activación de EGFR secundaria a la unión de IgG-PV al queratinocito va seguida de una fosforilación *downstream* de ERK, p38 MAPK, JNK, así como del factor de transcripción c-Jun (Frusic Zlotkin et al, 2006). En la ausencia de Dsg 3, la IgG-PV reduce significativamente tanto la activación de p38 como la JNK respecto a la producida cuando aquella está presente (Schmidt et al, 2009 (a), (b)).

-Oxido nítrico

El óxido nítrico se forma por la acción de las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) y juega un papel importante en la regulación fisiológica del cuerpo humano. Existen varias isoenzimas de la NOS presentes en diferentes tipos celulares incluidos los queratinocitos: la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS) (Lyons, 1995).

En la piel de enfermos con PV se ha demostrado un aumento de la expresión de la isoenzima iNOS y niveles elevados de óxido nítrico en el suero de estos pacientes (Siebra et al, 2006). Nuestro grupo de trabajo publicó que los queratinocitos acantolíticos de la piel del modelo murino presentan una expresión aumentada de iNOS, eNOS, nNOS y de residuos de nitrotirosina. Además, tras la administración de inhibidores de la nNOS e

inhibidores no específicos de NOS, se producía una ausencia de acantólisis clínica e histológica en el modelo murino de PV (Marquina et al, 2008).

-Placoglobina

Como componente de las uniones adherentes y desmosomas, la PG desempeña una función importante en el anclaje del citoesqueleto y ensamblaje de los desmosomas (Bierkamp et al, 1999). Se ha demostrado que la unión de IgG-PV a la Dsg 3 causa la disociación de la Dsg 3 de la PG (Aoyama et al, 1999). Pero, aún en ausencia de la PG se mantienen el anclaje de Dsg 3 en el citoesqueleto posiblemente por la presencia de otras proteínas de la placa desmosómica como la placofilina I (Candelari et al, 2001).

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). Su localización está alterada en el PV (Minogna et al, 2001). Se ha descrito 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.

Además se ha descrito que los cambios estructurales sufridos en los desmosomas tras la unión del anticuerpo a la Dsg 3 dependen de la PG (De Bruin et al, 2007). Algunos autores han afirmado también que la PG es un represor transcripcional del protooncogen *c-Myc* (Williamson et al, 2006 (b)) y que los niveles de este último se hayan aumentados en toda la epidermis de las lesiones de PV (Williamson et al, 2006 (a)).

Existen otras quinasas implicadas en el PV, como la PERK, que en cultivos de queratinocitos han mostrado un papel en la acantólisis (Lanza et al, 2011).

2.3.6. Cambios en el citoesqueleto

Los primeros trabajos referentes a los hallazgos que se producen tras la unión del anticuerpo del PV a los queratinocitos publican 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, culminando en el encogimiento de las células

basales (Hu et al, 1978). Pero, las publicaciones recientes muestran que la rotura de los tonofilamentos y el aumento del espacio intercelular ocurre antes de que los desmosomas presenten alguna alteración visible o pérdida de adhesión (Diercks et al, 2009). Así se ha demostrado que la reorganización del citoesqueleto es un paso fundamental para que se produzca la acantólisis en el PV (Gliem et al, 2010).

Existe una conexión entre los filamentos intermedios de queratina (tipo I y tipo II) y las proteínas constitutivas de las uniones de anclaje (**Figura 10**). Tras la unión del Ac a estas proteínas, se produciría una desestructuración y alteración de la función del citoesqueleto y se rompería el equilibrio entre las enzimas con actividad quinasas y fosfatasas localizadas en las uniones intercelulares, fosforilando residuos serina/treonina o tirosina.

Apoptosis en Pénfigo Vulgar

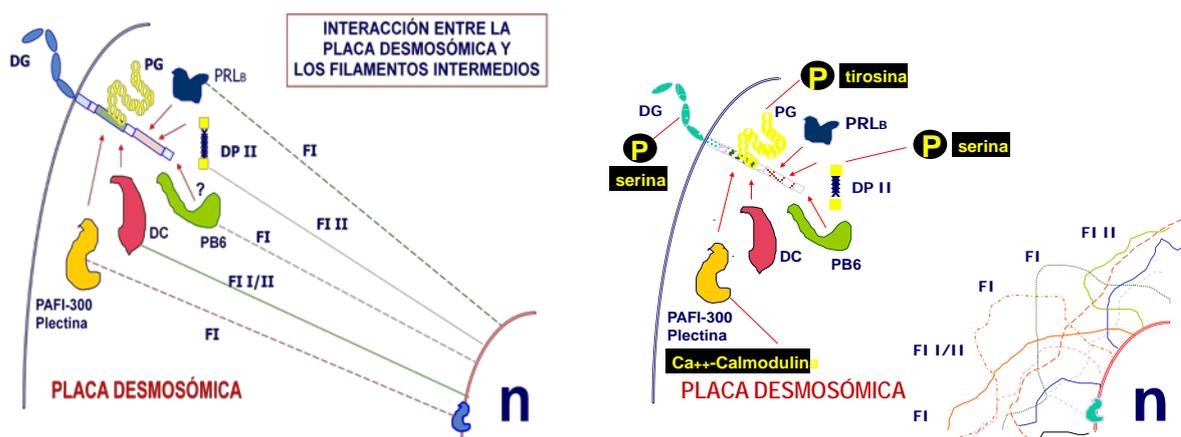


Figura 10. Conexión entre los FIn y las proteínas constitutivas de la placa desmosómica (A). Tras activación de mecanismos enzimáticos se desestructura el citoesqueleto (B)

La Src, FAK, PKC son enzimas quinasas que se han descrito en la uniones adherentes y en las uniones focales de los queratinocitos de la capa basal, es decir, en las uniones donde se anclan filamentos de actina. Así, aparentemente las uniones celulares conectadas a los filamentos de actina también tendrían los mecanismos enzimáticos para desensamblaje de las proteínas constitutivas de dichas uniones a través de la fosforilación de diferentes aminoácidos, principalmente en su componente citoplasmático.

Los cambios que se producen en el citoesqueleto tras la activación de los mecanismos enzimáticos apoyarían la hipótesis del “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 éstos. Este encogimiento estaría limitado a las células basales en el PV porque éstas se encogerían más que las células suprabasales tras el contacto con los Ac. Esto podría ser debido bien 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 aluden que si la acantólisis fuese debida a alteraciones en las propiedades adhesivas de las Dsg con la consecuente pérdida de la función del desmosoma, ésta 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 y, como ya hemos referido, los desmosomas sólo se separan en las fases más tardías de la acantólisis (Wilgram et al, 1961; Diercks et al, 2009).

2.3.7. Apoptosis

La apoptosis o “muerte celular programada”, es una forma de eliminar células 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.

La muerte celular por apoptosis lleva asociada cambios morfológicos y bioquímicos que afectan a todos los constituyentes de la célula como la membrana, el citoesqueleto, el núcleo y las mitocondrias.

Son muchos los factores y las vías que pueden modular y poner en marcha la apoptosis. Una forma frecuente es que ésta se produzca a través del complejo DISC,

mediante la vía Fas/FasL (Taylor et al, 2008). Así mismo la apoptosis está modulada por muchas proteínas reguladoras, unas anti-apoptóticas como las de la familia de las proteínas Bcl-2 y otras pro-apoptóticas como las BH3 u otras como Bax, Bak y Box (Rupinder et al, 2007), Apaf-1 y las caspasas (**Figura 11**).

Las caspasas, que son cisteína aspartato-proteasas específicas, constituyen una familia de proteínas intracelulares implicadas en la iniciación y ejecución de la apoptosis y en la respuesta inmune, que culmina en la producción de citocinas. Se sintetizan como precursores inactivos (zimógenos) y 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 (Thornberry, 1998) y ellas generalmente se activan por auto-proteólisis o bien por cofactores (Hengartner, 2000). Posteriormente, las caspasas efectoras rompen los sustratos intracelulares, provocando la muerte celular (Creagh et al, 2003).

Hasta la fecha, se han identificado 3 rutas principales que ponen en marcha la apoptosis asociada a la activación de caspasas en mamíferos (Creagh et al, 2003) (**Figura 11**). Las tres vías identificadas son la extrínseca o del Fas, la intrínseca o mitocondrial y la dependiente de granzima-B. Independientemente de la vía de activación de las caspasas, todas conducen a la activación de las principales caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7). En los poros de la mitocondria están las proteínas reguladoras Bax/Bcl-2. Cuando el índice de éstas se altera sale el citocromo C que se une a APAF1 y a la caspasa 9 formándose el apoptosoma que activa a la caspasa 3. Pero, como se muestra en el esquema la activación de caspasas no siempre es dependiente del apoptosoma (Cirillo et al, 2010).

La activación de caspasas está implicada en aspectos diferentes de la apoptosis como son la fragmentación nuclear (ver más adelante) y la reorganización del citoesqueleto. Se han descrito para las caspasas más de 400 dianas entre las que se encuentran la α y β actina, β y γ catenina, Dsc, Dsg 1 y 3, DP y E-caderina (Kitazumi et al, 2011). Además se ha detectado un efecto sobre diferentes quinasas como la FAK (Mian et al, 2008) y la MEKK1, la cual está implicada en la activación de p38 (Berkowitz et al, 2005).

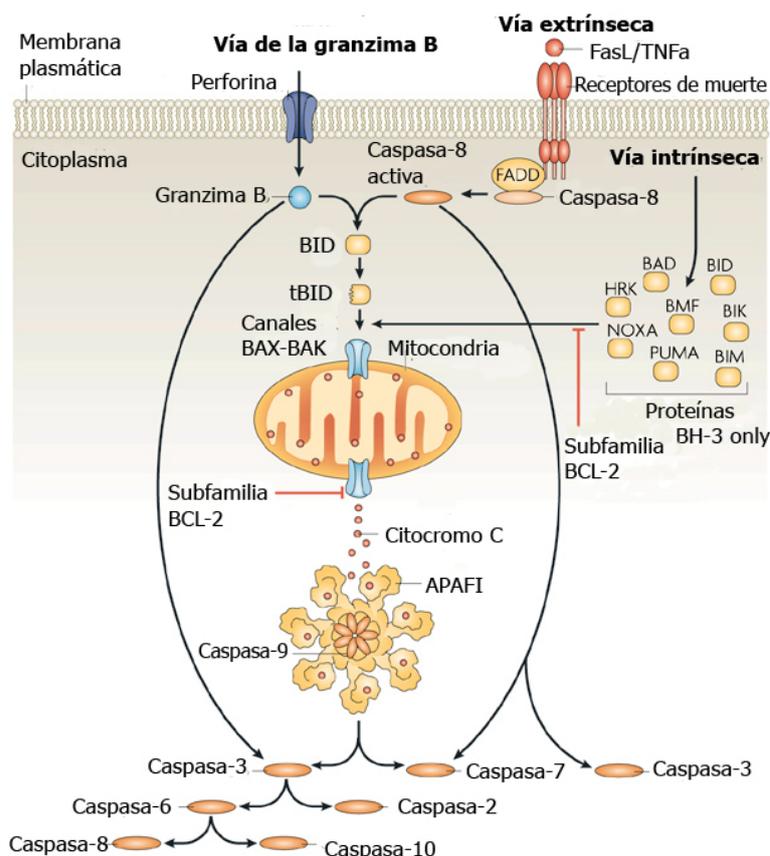


Figura 11. Esquema de las vías de activación de las caspasas (modificado de Taylor et al, 2008)

Los productos de la familia de genes de Bcl-2 parecen actuar como integradores de diversas señales positivas y negativas que condicionan la supervivencia celular. Según su función, podemos clasificarlos en dos subfamilias:

- los que promueven la supervivencia celular: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva, Nrf3 y BCL2L12 (Talieri et al, 2003)

- los que favorecen la muerte celular: Bax, Bak, Bok/Mtd, Rambo, Bcl-xs, Bik/Nbk, Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Blk, Hrk, Bnip3, Bnip3L, Nip, Noxa, Puma, Bcl-G y Bfk (Coultas et al, 2003).

La regulación de los productos de esta familia puede ser por dimerización, fosforilación o procesamiento proteolítico.

Otro elemento esencial en la respuesta apoptótica es la degradación del DNA nuclear en unidades nucleosómicas, sin ser indispensable para la muerte celular. Proteínas

que producen esta fragmentación son CAD, AIF y endonucleasa G. La proteína que inhibe a CAD es ICAD. La caspasa 3 está implicada en la regulación de la inhibición causada por ICAD a CAD. Cuando la caspasa 3 se activa, elimina la inhibición de la ICAD sobre CAD. Por otro lado caspasas-3 y -7 pueden fragmentar proteínas nucleares implicadas en la reparación del DNA.

Se piensa que la apoptosis juega un papel en las lesiones del PV. La presencia de marcadores de apoptosis ha sido constatada en lesiones precoces de PV previas a la acantólisis. Tanto en lesiones cutáneas como en piel perilesional de pacientes con PV y PF se ha observado 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 (Gniadecki et al, 1998). Además, se ha comprobado que la IgG-PV de los pacientes con PV induce marcadores moleculares de apoptosis en queratinocitos en monocapas de cultivos celulares (Pelacho et al, 2004). La activación de las caspasas-1, -3 y -8 ha sido observada después del tratamiento con IgG-PV de queratinocitos en cultivo y el pretratamiento con inhibidores de caspasas bloquea la acantólisis (Arredondo et al, 2005).

2.3.8. Teorías etiopatogénicas postuladas

Para explicar la etiopatogenia en el PV a lo largo de los años se han ido proponiendo varias teorías:

-Teoría compensatoria (*Desmoglein Compensation Theory*)

Se fundamenta en la diferente expresión de la Dsg 1 y 3 en la piel y en las mucosas para así explicar el nivel de acantólisis en la epidermis en el PV. En la epidermis del ser humano y ratón, la Dsg 3 se localiza principalmente en las capas más profundas y la Dsg 1 en los estratos más superficiales. Para que se produzcan ampollas en la piel es necesario que existan Ac anti-Dsg 1 y anti-Dsg 3. En mucosas, la Dsg 3 se expresa en todos los estratos, mientras que la Dsg 1 está casi ausente en las capas más profundas. Por lo tanto para que se produzcan ampollas en mucosas sólo hace falta anti-Dsg 3 circulantes (**Figura 12**).

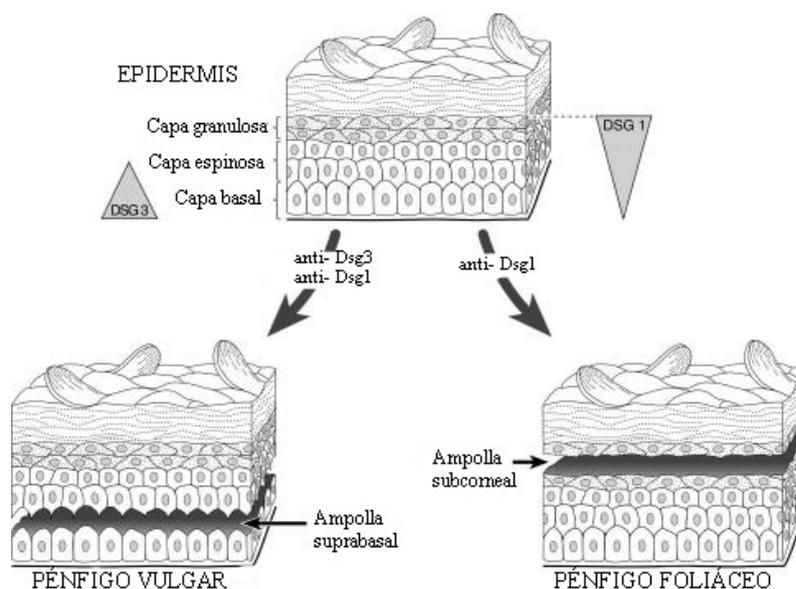


Figura 12. Esquema de la teoría compensatoria de las desmogleínas en el PV y en el PF

De acuerdo con este modelo, las ampollas en pacientes con PF ocurren a nivel subcórneo porque la Dsg 3 presente en estratos profundos compensa la pérdida de Dsg 1 producida por los Ac anti-Dsg 1. En el PV, las lesiones en la piel ocurren solamente cuando existen Ac anti-Dsg 1 y anti-Dsg 3 porque la Dsg 1 está presente en todas las capas epidérmicas y compensa la pérdida de Dsg 3 cuando solo existen Ac anti-Dsg 3 (**Figura 12**).

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 Ac anti-Dsg 1 y anti-Dsg 3) y los Ac anti-Dsg 1 no causan separación en la capa granulosa, ya que en el PF los Ac anti-Dsg 1 causan ampollas en estratos más superficiales. Además existen casos de PV en los que el perfil de Ac no se correlaciona con el fenotipo clínico del paciente. Asimismo, los ratones *knockout* para la Dsg 3 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 Ac anti-Dsg 1 y/o anti-Dsg 3 no desarrollan PV. Entre un 40% y un 71% de los familiares de primer grado de los pacientes con PV presentan títulos bajos de Ac, la mayoría de ellos sin manifestaciones clínicas (Kricheli et al, 2000). Algunas explicaciones para este fenómeno podrían ser que los títulos de Ac son demasiado bajos

para inducir la enfermedad; que estos Ac 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 Ac anti-Dsg.

Por último, la inactivación del gen de la Dsg 3 o la depleción de la Dsg 3 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.

-Teoría de la disrupción física (*Steric Hindrance Theory*)

Defiende que la unión del anticuerpo del PV a la región N-terminal de la Dsg 3 causaría un impedimento estérico en esta caderina imposibilitando la adhesión intercelular mediante la interferencia directa con las interacciones homo y heterotípicas de las Dsg de los desmosomas (Shimizu et al, 2004). La unión del anticuerpo del PV a la región N-terminal de la Dsg 3 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 la transinteracción homofílica de la Dsg 1 (Waschke et al, 2005).

-Teoría de las múltiples vías patogénicas de señalización (*Multiple Hit Theory*)

Defiende el hecho de que el suero de los pacientes con PV reconoce distintos antígenos y que la Dsg 3 sería sólo uno de ellos (Grando, 2000). Así si se bloquea la Dsc 3 con Ac, se forman ampollas intraepidérmicas (Splinder et al, 2009; Aoyama et al, 2010). Cada antígeno contribuiría de forma coordinada a la acantólisis por una única vía de señalización intracelular, que se complementaría y actuaría sinérgicamente con las demás a la pérdida de adhesión y formación de ampollas.

-Teoría de que los anticuerpos inducen apoptosis

Se ha sugerido que la apoptosis puede ser el mecanismo que conduce a la acantólisis (Wang et al, 2004; Puviani et al, 2003; Pelacho et al, 2004) basándose en que la IgG-PV y/o los Ac anti-FasR elevan los niveles intracelulares de FasL y FasR, Bax y p53 con la consiguiente activación de caspasas. Pero también se ha planteado que la apoptosis, como fragmentación nuclear, puede no ser necesaria para la acantólisis ((Schmidt et al, 2009 (a), (b)). En cualquier caso, el PV sería consecuencia de la disminución de la adhesión celular y de la apoptosis estando desencadenados ambos hechos por la IgG-PV (Pan et al, 2011).

-Teoría del “encogimiento de las células basales”

Como ya he referido, Bryston y cols. postulan que la acantólisis sería el resultado de la retracción del citoesqueleto que provocaría un encogimiento celular, el cual estaría limitado a las células basales en el PV porque éstas se encogerían más que las células suprabasales tras el contacto con los anticuerpos (Brystyn et al, 2006).

Los autores comentan que si la acantólisis fuese debida a alteraciones en las propiedades adhesivas de las Dsgs, aquella debería ocurrir primero en los desmosomas. Sin embargo, se ha comprobado que la acantólisis empieza en las áreas interdesmosomales donde no hay desmosomas y como ya hemos referido los desmosomas sólo se separan en las fases más tardías de la acantólisis (Wilgram et al, 1961; Diercks et al, 2009).

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 activen distintas vías de

señalización intracelular respecto a las células suprabasales (Ndoye et al, 1998). Además, en las células basales existen distintos tipos de queratinas que en las suprabasales. Las basales expresan K5 y K14, mientras que las suprabasales K1 y K10 (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 explicar así porque el encogimiento celular se limita a las basales.

-Teoría de la apoptólisis

En el año 2009, Grando y cols. proponen el término de apoptólisis tratando de unir la acantólisis suprabasal y la muerte celular como ruta hacia el encogimiento celular (Grando et al, 2009). La diferencia fundamental entre apoptosis y apoptólisis, es que este último concepto implica que las células basales se encogen, pero no mueren (**Figura 13**).

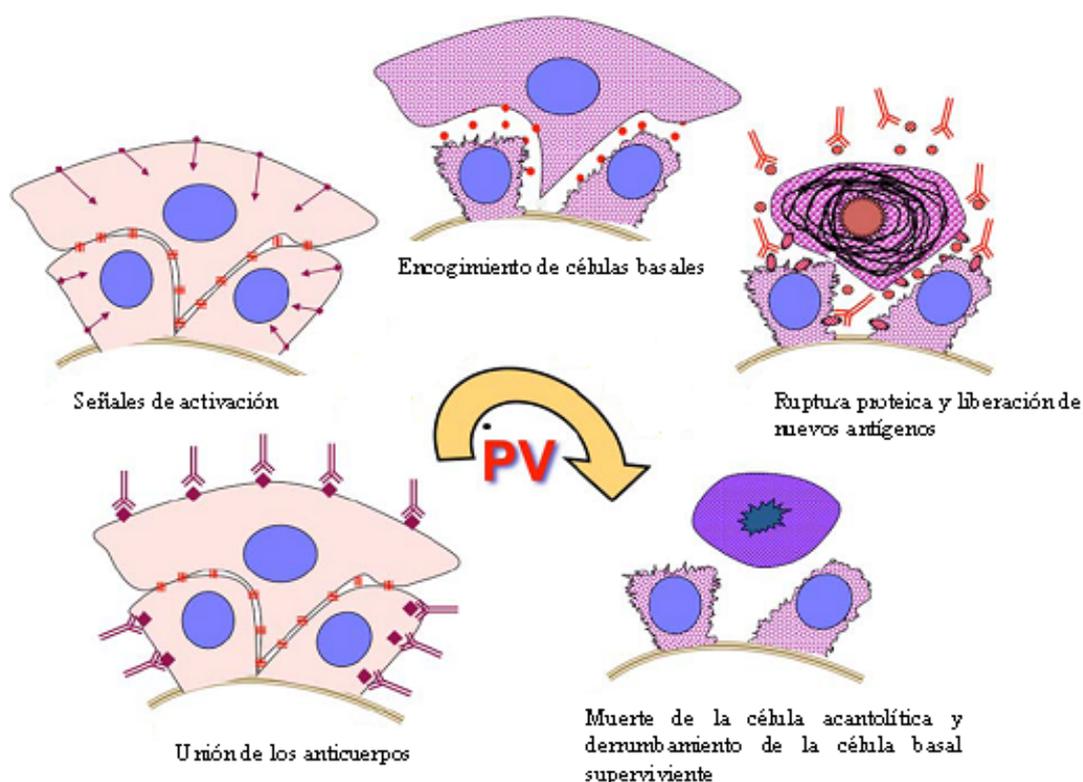


Figura 13. Esquema que muestra la teoría de la apoptólisis (modificado de Grando et al, 2009)

La acantólisis y la apoptosis son dos hechos inseparables en PV. Ambos están desencadenados por la unión de la IgG al queratinocito y mediados por enzimas de muerte celular. Este hecho se hace evidente en las publicaciones que muestran que inhibidores de Src, EGFR, p38MAPK y mTOR bloquen tanto la acantólisis como la apoptosis e inhibidores de caspasas previenen tanto *in vitro* como *in vivo* la acantólisis (Grando et al, 2009; Lee et al, 2009; Joly et al, 2010; Pretel et al, 2009).

2.4. Manifestaciones clínicas

El PV se caracteriza por la aparición de ampollas flácidas en la mucosa oral que posteriormente se extienden a otras localizaciones de la cavidad oral, como encías, úvula, lengua, labios y pilares amigdalinos (**Figuras 14A-D**). Estas lesiones suelen ser dolorosas, interferir con la alimentación del paciente y por lo general no curan espontáneamente. Se piensa que la cavidad oral está afectada hasta en el 94% de los casos.

Los pacientes con afectación de mucosa orofaríngea pueden presentar también afectación esofágica (zona distal y medial) hasta en el 87,5%. Como sintomatología presentan disfagia, odinofagia, hematemesis y en ocasiones vómitos.

En un estudio realizado en nuestro centro se evaluó a 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. 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: el 62% de ellos presentaban afectación de la mucosa nasal, aunque únicamente tenían síntomas (epistaxis, costras nasales) el 38%; el 75% tenían lesiones activas en la laringe (100% de los casos de PV predominantemente mucoso), de los cuales sólo el 44% presentaban síntomas como la disfonía o ronquera; el 62% 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 (España et al, 2007).

No se sabe exactamente la frecuencia de afectación del PV en otras superficies mucosas. 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 15A**).

La frecuencia de afectación del tracto genital femenino por el PV es desconocida. Estudios recientes señalan que hasta el 51% de sus pacientes mujeres tenían afectación genital en algún grado, siendo la segunda localización más afectada tras la mucosa oral (Akhyani et al, 2008). 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).

La afectación del tracto genital masculino es poco frecuente y suele ocurrir en formas cutaneo-mucosas severas (Sami et al, 2001).

Aunque es infrecuente también pueden verse lesiones en región periungueal en forma de paroniquia (**Figura 15B**), onicomadesis y traquioniquia (Carducci et al, 2008).

La afectación ocular del PV es rara (Daoud et al, 2005), pero podría estar infravalorada, no desarrollándose necesariamente en el contexto de formas severas de la enfermedad y no asociándose a peor pronóstico (Palleschi et al, 2007). Las manifestaciones clínicas más frecuentes suelen ser conjuntivitis y blefaritis; excepcionalmente se observan ampollas o erosiones de la conjuntiva bulbar/palpebral o en el margen palpebral próximo al lacrimal (**Figuras 16A,B**).

Las lesiones cutáneas suelen aparecer meses o incluso años después de las lesiones mucosas, aunque a veces aparecen de forma paralela a éstas. Es característico el signo de Nikolsky, que se manifiesta como un despegamiento epidérmico al ejercer presión tangencial sobre la piel clínicamente sana. Las lesiones cutáneas suelen ser ampollas tensas, menores de 1 cm, que con los días se vuelven flácidas. A veces pueden ser mayores y confluyentes afectando grandes superficies de piel. Las localizaciones más frecuentes son el cuero cabelludo, cabeza, cuello, flexuras y línea media de espalda (Joly et al, 2011) porque en estos sitios existe una mayor cantidad de Dsgs (**Figuras 17A,B**). El techo de la ampolla suele romperse con facilidad y normalmente las lesiones se observan en forma de erosiones o costras (**Figuras 18A-D**). Cuando las lesiones curan, normalmente tras el tratamiento, no suelen dejar cicatrices residuales, salvo una hiperpigmentación post-inflamatoria.

Figura 14. **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 15. **A)** Afectación perianal del PV; **B)** PV que afecta a uñas de manos ocasionando erosiones, paroniquia y onicomadesis



Figura 16. **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

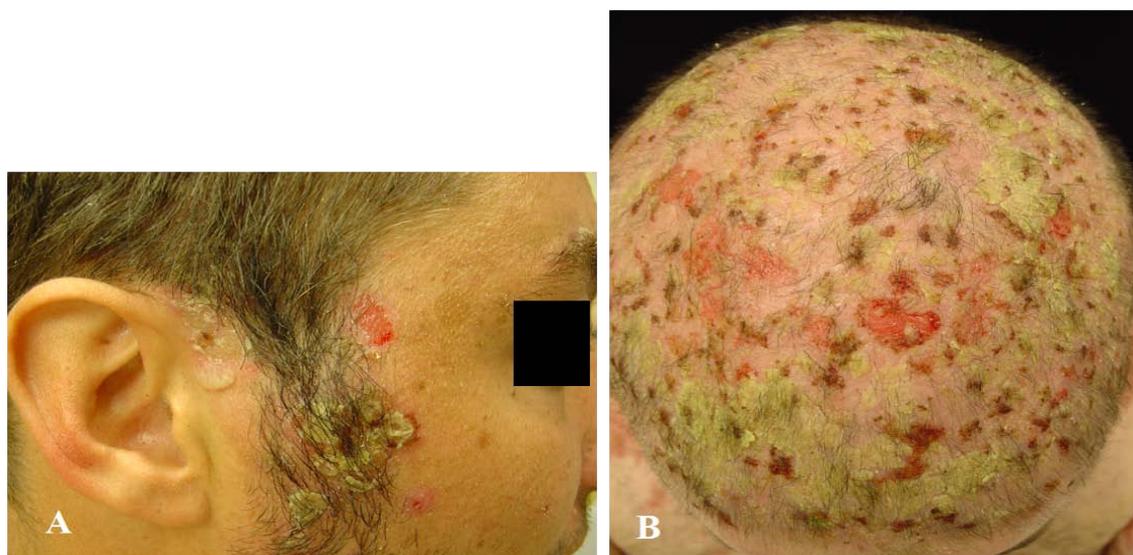


Figura 17. **A)** Afectación del cuero cabelludo del PV. Se observan lesiones costrosas en región facial y cuero cabelludo; **B)** Lesiones erosivas y costrosas en cuero cabelludo de paciente con PV cutáneo-mucoso que condicionan una alopecia no cicatricial



Figura 18. **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 ampollosas erosionadas en glúteos de mujer con PV; **D)** Erosiones y costras en región facial de varón con PV cutáneo-mucoso

2.5. 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 IFI, y se si dispone de ello buscar si los pacientes presentan anticuerpos circulantes frente a la Dsg 1 y 3 mediante técnica de ELISA. Sólo si tenemos alguna duda diagnóstica realizaremos técnicas de *immunoblot* o inmunoprecipitación.

2.5.1. Histopatología

La acantólisis suprabasal es el dato más característico. 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 19A-B**).

2.5.2. Inmunofluorescencia indirecta y directa

La IFI detecta los anticuerpos circulantes, conocidos como Ac anti-SIE. Los Ac 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 Ac 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 anti-SIE se emplea para valorar la evolución de los enfermos a lo largo de la enfermedad y su respuesta al tratamiento (Bhol et al, 1994). No obstante, esta técnica tiene varios inconvenientes. En concreto, no permite determinar frente a qué estructuras se

unen los Ac y detecta también Ac no patogénicos contra antígenos presentes en el epitelio normal.

La IFI es útil para confirmar el diagnóstico de PV y para diferenciar entre enfermedades ampollosas similares. En el PV, al igual que en la mayoría de enfermedades ampollosas, los Ac 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 Ac en la sustancia intercelular. La intensidad de la fluorescencia suele ser mayor en los dos tercios inferiores de la epidermis.

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 and Adams, 2001). Este fenómeno hace alusión a un resultado falsamente negativo en el estudio de IFI en sueros que contienen altos títulos de Ac. En estos casos existe una discordancia entre el número de moléculas de antígeno y Ac, de forma que los receptores se saturan con rapidez, impidiendo el acceso de otros Ac. Para solventar este problema, los sueros de los pacientes pueden diluirse y realizar entonces la prueba de IFI.

La IFD detecta 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 miran estas preparaciones 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 y complemento (C3) con el mismo patrón, aunque en ocasiones se detectan depósitos de IgA (**Figura 20A**). El depósito de IgG granular que se detecta con cierta frecuencia no refleja la distribución normal de la Dsg; se sugiere que la IgG induce la formación de racimos de autoantígenos de Dsg procedentes de la Dsg deplecionada de los desmosomas y de la no unida (Oktarina et al, 2011). 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.

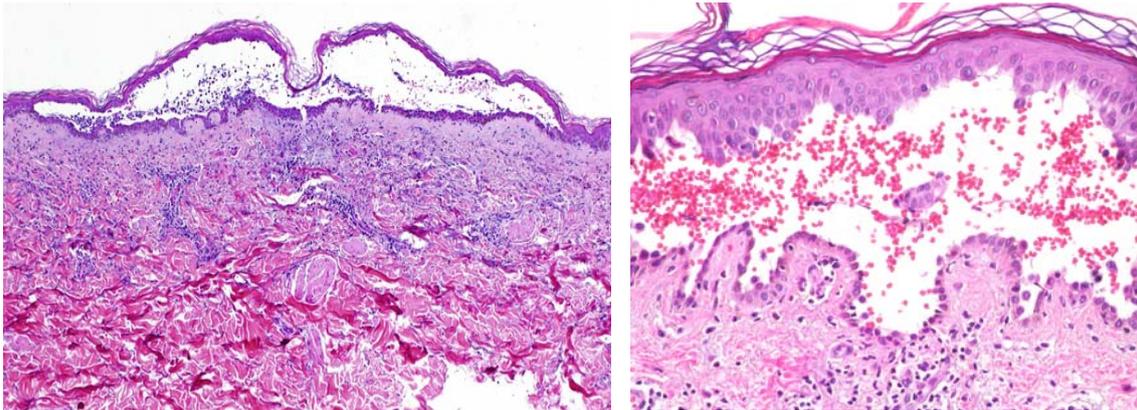


Figura 19. A) Ampolla intraepidérmica; B) con acantólisis suprabasal, y células inflamatorias junto a abundantes hematíes en el interior de la hendidura epidérmica (hematoxilina-eosina)

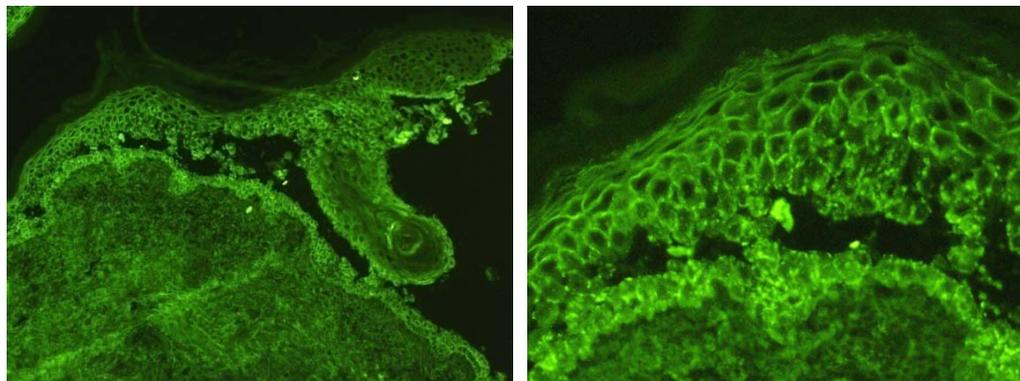


Figura 20. A) Imágenes de IFD del PV. Se observan depósitos pericelulares de IgG en los queratinocitos en los dos tercios inferiores de la epidermis; B) Imagen de detalle

2.5.3. *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 una banda de 130 kDa (Dsg-3), y con menor frecuencia, otra de 160 kDa (Dsg 1). Además se puede detectar una banda de 85 kDa, 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 kDa (denominada complejo del PV), otra de 130 kDa (Dsg 3) y una tercera de 85 kDa, que corresponde a la PG (Stanley et al, 1984). En un porcentaje variable de pacientes se detecta también una banda de 160 kDa. Esta técnica tiene varios inconvenientes. El principal es su alto coste, además de que su tiempo de realización que es mayor que el *immunoblot* y necesita el uso de radiactividad.

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

2.5.4. ELISA

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

Existe un *kit* comercial que detecta la presencia de anticuerpos contra la Dsg 1 y la Dsg 3, basado en el uso de moléculas recombinantes de estas moléculas sintetizadas con el sistema del baculovirus así como otro que detecta anticuerpos frente a Dsg 4.

Estas determinaciones deben realizarse en fases de actividad de la enfermedad, ya que cuando los pacientes entran en remisión negativizan primero los anti-Dsg 3 y pacientes con PV podrían erróneamente diagnosticarse de PF por esta técnica (Ishii et al, 1997).

2.6. Pronóstico

La mortalidad estimada es del 5 al 12%, asociada principalmente a los efectos secundarios de los corticoides e inmunosupresores, en particular infecciones severas (Joly et al, 2011; Risser et al, 2009; Alexandroff et al, 2009).

2.7. Tratamiento

Además del tratamiento farmacológico, son importantes una serie de factores preventivos y determinadas medidas higiénico-dietéticas como evitar traumatismos locales, no emplear adhesivos cutáneos, manejar a los pacientes sin presionar la piel, evitar la ingesta de alimentos sólidos, ingerir dietas hipercalóricas e hiperproteicas, recomendar el empleo de fotoprotectores. 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 tenía una mortalidad muy elevada. Los corticoides sistémicos y los inmunosupresores han mejorado considerablemente el pronóstico, 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.

La terapia de primera línea son los corticosteroides sistémicos aunque se ha propuesto el propionato de clobetasol al 0,05% en crema para controlar las lesiones de PV moderado (Dumas et al, 1999). El beneficio se fundamenta en su efecto antiinflamatorio, con una acción inhibitoria de vías intracelulares que intervienen en los mecanismos

inflamatorios y que están implicadas en la acantólisis del PV. Se ha comprobado que la metilprednisolona bloquea la fosforilación de la Dsg 3, E-caderina, β - y γ -catenina inducida por PV-IgG (Nguyen et al, 2004 (b)). No es del todo conocido el efecto que tienen los corticosteroides 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. 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 mayoría de los pacientes se controlan con una dosis de 1-2 mg/kg/día. Si no mejoran con esta dosis después de 1 mes de tratamiento, deberemos buscar otra alternativa terapéutica (Mutasim, 2004). Cuando se consigue una remisión clínica, se debe intentar disminuir la dosis progresivamente y llegar a una dosis de mantenimiento de 5 mg/día.

Los efectos adversos de los corticoides son numerosos. Dentro de los inmediatos están retención de sales, aumento del apetito y del peso, enfermedades neuropsiquiátricas (insomnio, irritabilidad, euforia, depresión, episodios maníacos, irritabilidad). A largo plazo aparecen infecciones, hábito cushingoide, diabetes, osteoporosis, osteonecrosis, miopatía, sangrado gastrointestinal, cataratas, adelgazamiento de la piel y toxicidad del sistema nervioso.

La administración de corticosteroides por vía intravenosa en forma de *bolus* de metil-prednisolona se puede plantear en pacientes con formas graves de la enfermedad (Mentink et al, 2006).

La azatioprina, la ciclofosfamida y el micofenolato mofetilo se usan normalmente en combinación con los corticosteroides como fármacos adyuvantes de éstos. 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. La azatioprina es probablemente el menos efectivo pero se utiliza con mayor frecuencia por su mejor perfil de seguridad a dosis de 2-4 mg/kg/día (normalmente 100-300 mg/día)(Benoit et al, 2003).

La ciclofosfamida, como agente ahorrador de corticoides, se emplea en casos de PV muy severos. Es un fármaco alquilante que bloquea el crecimiento celular y la actividad mitótica. Se administra en dosis de 1-3 mg/kg/día. Se ha observado que cuando se administra en *bolus* intravenosos cada 2 semanas o mensualmente, la eficacia aumenta y sus efectos adversos disminuyen (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, enzima que interviene en la síntesis de purinas, un paso crítico para la proliferación de linfocitos. Debido a su perfil de seguridad y eficacia está sustituyendo a la azatioprina como inmunosupresor adyuvante en la terapia del PV (Enk et al, 1999; Beissert et al, 2006). Se usa a una dosis de 35-40 mg/kg/día (2 ó 3 gr/día) (Mimouni et al, 2003).

La ciclosporina no parece un fármaco de gran eficacia para el tratamiento del PV.

La plasmaféresis es útil para disminuir rápidamente el título de anticuerpos circulantes. Debe tenerse en consideración en formas graves de PV donde no ha habido respuesta a la combinación de corticoides e inmunosupresores (Bystryn and Steinman, 1996), en aquellos pacientes en los que tienen un título elevado de SIE circulantes y en los que no podamos emplear fármacos inmunosupresores como en mujeres embarazadas. La inmunosupresión concomitante con corticosteroides 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, 2001). Recientemente se ha demostrado que su administración permite reducir de forma significativa el título de anticuerpos circulantes frente a la Dsg 1 y 3 del tipo IgG4 (Green et al, 2008) y que aumentan los niveles de los inhibidores de las proteínas apoptóticas (Toosi et al, 2011; CzerniK et al, 2012) .

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). El rituximab deplecciona transitoriamente los linfocitos B CD20-+ de la circulación. Ha sido empleado en más de un millón de pacientes con linfoma no Hodgkin CD20-+ y se han observado pocos efectos adversos graves. Se administra vía intravenosa a dosis de 375 mg/m² semanalmente durante 4 semanas. Según algunos

estudios, 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). Otros fármacos biológicos que han resultado eficaces son etanercept (Shetty et al, 2009), adalimumab en el pénfigo IgA (Howell et al, 2005) y daclizumab (Renkl et al, 2004).

El inhibidor de p38 MAPK (KC-706) se ha empleado en un estudio multicéntrico en 15 pacientes con PV con respuesta parcial (Schultz, 2011).

La nicotinamida se emplea con relativa frecuencia en el PV y al 4% en gel para las lesiones de mucosa oral ha resultado ser beneficiosa (Iraji and Banan, 2010). Su mecanismo exacto se desconoce, pudiendo estimular la adhesión de los queratinocitos a través de su efecto colinérgicomimético.

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). Recientemente se ha publicado la combinación de rapamicina con altas dosis de Ig intravenosa permitiendo un rápido control de la enfermedad y retirada de corticoides (Grando et al, 2011). Posiblemente el beneficio sea secundario al efecto inmunosupresor y protector del queratinocito frente a la acción de los autoanticuerpos que tiene la rapamicina.

II.- OBJETIVOS

Analizando los datos expuestos, podemos concluir que hoy en día 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 se produzca 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.- Comprobar si la FAK activada tiene un papel en el PV, tanto en la acantólisis como en la apoptosis. Para ello, estudiaremos mediante inmunohistoquímica la presencia de FAK fosforilada en los residuos tirosina 397/925, en la epidermis obtenida de los ratones C57 a los que administraremos IgG-SN o IgG-PV. A su vez, analizaremos cual es el efecto del pretratamiento con un inhibidor específico de FAK en nuestro modelo murino de PV, tanto clínica como histológicamente valorando la presencia de ampolla, acantólisis y células TUNEL positivas.

2.- Conocer la relación que puede haber entre la FAK y diferentes vías de señalización molecular implicadas en el PV. Analizaremos cual es el efecto en nuestro modelo murino de PV de inhibidores específicos de Src, mTOR, isoformas HER y caspasas al administrarlos antes de la inyección de IgG-PV sobre la actividad de la FAK, tanto clínica como histológicamente y determinando niveles de expresión de P-FAK en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de la epidermis.

3.- Siendo conscientes del papel que puede tener el mecanismo de apoptosis dentro de la patogenia del PV, nos interesa estudiar en nuestro modelo de PV parámetros que reflejen la posible relación existente entre la FAK y la apoptosis. Para ello, determinaremos los niveles de expresión de Bax y Bcl-2, así como la actividad de caspasas-3 y -9 en los ratones que han sido retratados con inhibidor específico de FAK previo a la administración IgG-PV.

4.- Estudiaremos también la relación entre parámetros de apoptosis y vías de señalización intracelular implicadas en la patogenia de PV. Para ello, determinaremos los niveles de expresión de Bax y Bcl-2, así como la actividad de caspasas-3 y -9 en nuestro modelo murino de PV pretratado con inhibidores específicos de Src, mTOR e isoformas HER.

5.- Además analizaremos si la actividad de las quinasas Src y mTOR están reguladas por la FAK. Este objetivo lo desarrollaremos mediante la realización de estudios de inmunohistoquímica, determinando la expresión de P-Src y P-mTOR en la capa basal de la epidermis de los ratones tratados con inhibidor de FAK previo a la administración de IgG-PV, y comparándola con la encontrada en las muestras de los ratones tratados tanto con IgG-SN como con IgG-PV.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

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 de un control sano.

- Paciente 1 (PV1)

Mujer de 28 años diagnosticada de PV en enero de 2001. En marzo de 2002 por 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 anticuerpos anti-sustancia intercelular (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 (**Figura 21**).

- Paciente 2 (PV2)

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 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 (**Figura 22**).

- Paciente 3 (PV3)

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 detectado era de 1/320. Se instauró tratamiento con 3 sesiones más de plasmaféresis (momento de la obtención del suero) junto con prednisona 80 mg/día (**Figura 23**).

- Control sano (SN)

Se obtuvo del banco de sangre de la Clínica Universidad de Navarra, de donante de plaquetas, descongelado para transfundir pero no siendo necesario utilizarlo finalmente.

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

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).

2. 1. Inmunofluorescencia indirecta

Para determinar el título de anticuerpos circulantes se testaron los 4 sueros empleados, siguiendo la técnica descrita por diferentes autores (Emery et al, 1995; Mascaró 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). Con los sueros de los pacientes con PV se observaron depósitos de IgG en los dos tercios inferiores del epitelio, siendo negativo el resultado con el suero control (**Tabla 2**).

2. 2. ELISA

En el laboratorio de Inmunología de la Clínica Universidad de Navarra se realizó el estudio de ELISA con un *kit* comercial (Mesacup Dsg-1 & Dsg-3 ELISA, MBL, Nagoya, Jipán). Los valores de referencia fueron: negativo < 7, positivo débil 7-20, positivo > 20. Se observaron la presencia de Ac anti-Dsg 1 y 3 en los 3 pacientes afectados de PV, siendo negativos en el control sano (**Tabla 2**).

2. 3. Inmuprecipitación

El estudio de inmunoprecipitación, 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,



Figura 21. Paciente 1. Lesiones erosivas y ampollosas localizadas en tronco y extremidades



Figura 22. Paciente 2. Lesiones de PV, consistentes en erosiones extensas y ampollas que cubren una amplia zona de la superficie cutánea



Figura 23. Paciente 3. Este paciente presentaba extensas lesiones en cara, tronco y extremidades, observándose amplias zonas erosionadas

que se corresponden con las bandas de 75 kDa y 66 kDa respectivamente. El procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología del Dr. L.A. Díaz (Wisconsin, EEUU) siguiendo el método convencional descrito (Ding et al, 1999). Las bandas se visualizaron mediante autorradiografía (**Figura 24**).

	SN	PV1	PV2	PV3
IFI	Negativo	1/320	1/640	1/320
ELISA				
Ac-anti Dsg 1	Negativo	60 U/ml	189 U/ml	77 U/ml
Ac-anti Dsg 3	Negativo	173 U/ml	67 U/ml	160 U/ml
Inmunoprecipitación				
Banda de 75kDa (Dsg 1)	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Banda de 66 kDa (Dsg 3)	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 2. Valores de IFI, ELISA e inmunoprecipitación de los sueros empleados en nuestra experimentación

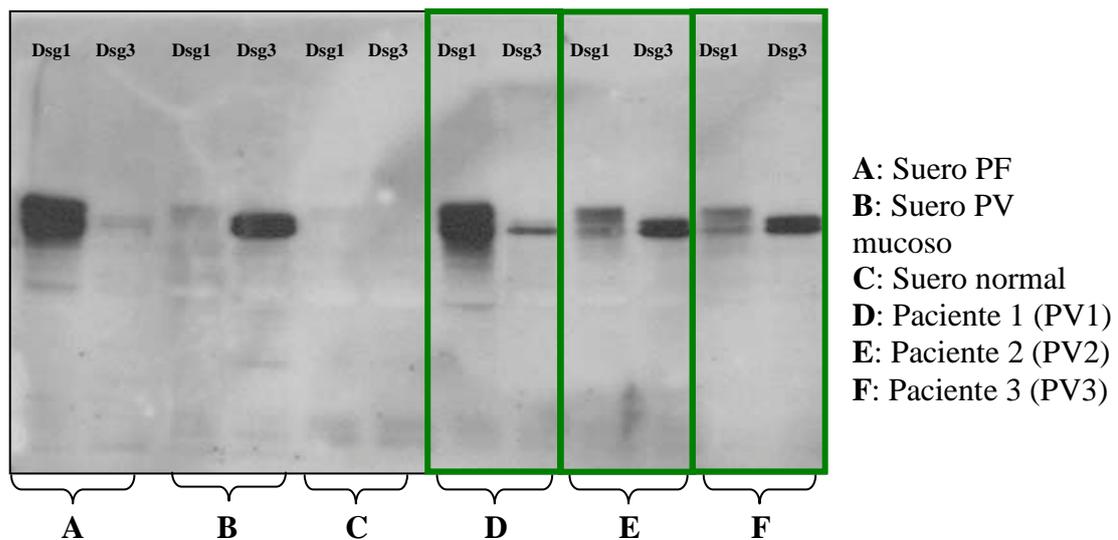


Figura 24. Imagen de las bandas obtenidas mediante la técnica de inmunoprecipitación de los distintos sueros empleados

3. Purificación de IgG

La purificación de fracciones de IgG se realizó según la técnica seguida por la mayoría de los autores con pequeñas modificaciones (España et al, 1997).

Los sueros de pacientes con PV fueron obtenidos mediante extracciones de sangre periférica como parte del tratamiento de plasmaféresis. Una vez extraídas las muestras se congelaron a -40°C en bolsas de 450 ml hasta su utilización. En el momento en que íbamos

a emplear el suero, la bolsa se descongelaba a 4°C y la repartíamos en tubos Falcón de 50 ml, añadiendo posteriormente a cada Falcón 1,4 ml de trombina, previamente reconstituida con 4 ml de PSB 1x (7 U/ml plasma) (Sigma). A continuación, se introdujeron durante 30 minutos al baño a 37°C en agitación suave. Posteriormente sacamos los coágulos formados con pipetas Pasteur y pasamos el suero a un vaso de precipitado. Pusimos el vaso de precipitado en agitación y añadimos lentamente el mismo volumen de persulfato amónico saturado al 100% (pH 7,3) dejándolo durante 30 minutos en agitación. A continuación se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 rpm (17400G) (Rotor SS-34) a 4°C.

Una vez centrifugado se eliminó el sobrenadante y se dejó secar los *pellets* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Resuspendimos cada *pellet* con 4 ml de (suero salino con tapón fosfato) PBS 1x. Con el fin de eliminar el persulfato de amonio, se colocó el preparado en las bolsas de diálisis durante 24 horas, a 4°C y en agitación, recambiando el medio de PBS a las 12 horas. Finalizada la diálisis, pasamos el contenido a tubos Falcón desechando el precipitado.

Posteriormente se realizó la purificación de IgG mediante cromatografía de afinidad (ÄKTA™ FPLC™, Amersham Biosciences), pasando 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-kDa) (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.

4. Modelo de experimentación animal

Se utilizaron para la experimentación ratones C57BL/6J recién nacidos de 24-48 horas de vida, con un peso comprendido entre 1.5-1.9 g, tal y como previamente nuestro grupo había empleado (Sánchez-Carpintero et al, 2004; Marquina et al, 2008; Pretel et al, 2009).

Las colonias de progenitores fueron adquiridas de *The Jackson laboratory* (Maine, USA) y 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 (024/08), basada en las directrices correspondientes de la Unión Europea y en las normas establecidas por el Gobierno de Navarra.

5. Experimentos de transferencia pasiva

Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado para cada suero (3 ratones por cada suero). La IgG purificada de los pacientes se administró intradérmicamente en el dorso de los ratones, con una aguja de 29 G, a una concentración de 2 mg de IgG por gramo de peso del ratón (en un volumen no superior a 100 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 comprobó a las 12 horas tras la inyección, basándonos en la cronología de aparición de lesiones en estudios previo de nuestro grupo, mediante la realización del signo de Nikolsky empleando esta 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) (Sánchez-Carpintero et al, 2004).

A continuación se sacrificaron los ratones mediante decapitación. De la zona central del área tratada se obtuvieron muestras que se introdujeron 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), o en suero fisiológico dependiendo del proceso al que posteriormente iban a ser sometidas (**Figura 25**).

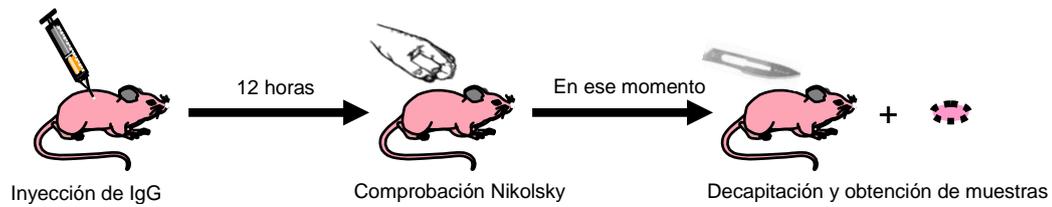


Figura 25. Esquema que muestra el procedimiento llevado a cabo durante los experimentos de transferencia pasiva de IgG

Nuestro modelo experimental tal y como se muestra en otros trabajos publicados de nuestro grupo de investigación era adecuado, por lo que no realizamos ni IFD ni IFI.

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.

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 del inhibidor y se introdujeron en fijador de zinc o suero fisiológico según el procedimiento posterior al que iban a ser sometidas. Se administraron 5 inhibidores diferentes comprados a Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA, USA/ Darmstadt, Germany). Para su inyección fueron diluidos en DMSO al 10% (**Figura 26**).

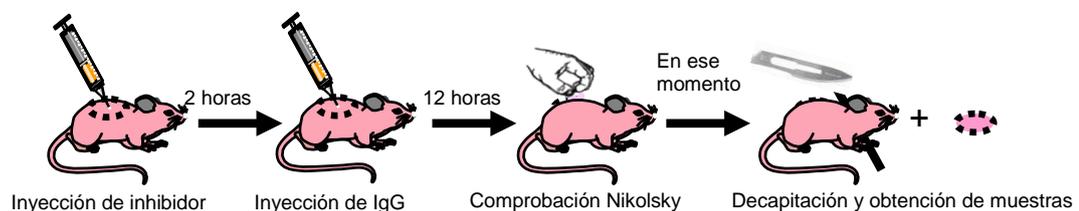


Figura 26: Esquema que muestra el procedimiento llevado a cabo durante los experimentos de tratamiento con inhibidores previos a la transferencia pasiva de IgG

6. 1. 6-((4-((3-Methanesulfonyl)benzyl)amino)-5-trifluoromethylpyridin-2-yl)amino)-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one (PF-573,228)(FI)

Es una pirimidinildiamino permeable a nivel celular que actúa selectivamente compitiendo con el ATP, inhibiendo la FAK. Es un inhibidor de FAK de la forma fosforilada en el residuo tirosina 397 en varias líneas celulares humanas, de ratón y de perro.

Tomamos como referencia un trabajo (Slack-Davis et al, 2007) y se estableció la dosis adecuada tras un estudio previo en el que determinamos la eficacia sin mortalidad con las dosis de 2 µg/g, 5 µg/g y 8 µg/g peso corporal. Finalmente se empleó la dosis de 5 µg/g (**Tabla 3**).

6. 2. 4-Amino-1-tert-butyl-3-(1'-naftil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (PP1)

El PP1 es una pirazolopirimidina sintética y un nuevo, potente y selectivo inhibidor de las tirosinas quinasas de la familia Src. Tiene una alta selectividad para 1338G_v-Src con respecto al global de Src-v. Para su inyección fue diluido con DMSO al 10%.

La dosis utilizada fue de 1 µg/g de peso del animal según estudios previamente publicados (Jadhav et al, 2007) (**Tabla 3**).

6. 3. Rapamicina

La rapamicina es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* con propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas. Es un inhibidor de la mTOR. Se une a la proteína citosólica FKBP12 interfiriendo así en su unión con mTOR.

La dosis utilizada fue de 5 µg/g de peso del animal según estudios previamente publicados (Teachey et al, 2006 (a), (b)) (**Tabla 3**).

6. 4. N-[4[(3-Bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida, EKI-785. (CL-387,785) (CL)

Inhibidor de las isoformas HER. *In vivo* actúa inhibiendo de manera irreversible la actividad quinasa de EGFR y la autofosforilación de éste en residuos tirosina.

Para administrar la dosis inicialmente nos basamos en un trabajo publicado (Sweeney et al, 2000) pero realizamos un estudio previo de toxicidad para establecer la

concentración adecuada. Usamos las dosis de 90 µg/g, 50 µg/g, 25 µg/g y 10 µg/g peso corporal, siendo esta última la que resultó óptima para la inhibición de la enfermedad sin producir mortalidad (**Tabla 3**).

6.5. 4 cpm-VAD-CHO (Inhibidor pan-caspasas) (PCI)

Es un inhibidor pan-caspasas reversible. Su acción se centra en la inhibición global de la acción de todas las caspasas que intervienen en el proceso de apoptosis. Para su inyección fue diluído 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 3**). En ningún caso observamos en los animales problemas de toxicidad o fallecimiento con la dosis empleada.

INHIBIDOR	INHIBICIÓN DE	DOSIS	DISOLVENTE
PF-573, 228	FAK	5 µg/g	10% DMSO
PP1	Src	1 µg/g	10% DMSO
Rapamicina	mTOR	5 µg/g	10% DMSO
CL-387, 785	HER	10 µg/g	10% DMSO
PCI	Caspasas	1,6 µg/g	10% DMSO

Tabla 3. Cuadro en el que se muestran las características de los distintos inhibidores utilizados

7. Hematoxilina-eosina

Se realizó en las muestras obtenidas de piel de los ratones tanto de los que habían recibido la transferencia pasiva de IgG únicamente, como en aquellos que había sido pretratados con inhibidores. Primero fue introducida 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 tal y como nuestro grupo de trabajo había empleado previamente (Pretel et al, 2009): negativo (ausencia de acantólisis en toda la preparación), + (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 preparación).

8. Inmunohistoquímica

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

Las muestras de piel de ratones obtenidas del interior de la zona inyectada, tanto con IgG-SN como con IgG-PV con o sin un inhibidor previo a la inyección de IgG-PV, tras su fijación en un fijador de zinc, fueron incluidas en parafina (**Figuras 25 y 26**).

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 citrosol (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 10 mM (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*. 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 y se incubó a 4° C toda una noche en cámara húmeda. Las características de los anticuerpos utilizados se exponen en la **Tabla 4**.

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 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se lavaron abundantemente con la solución de lavado (PBS cada 5 minutos) y se secó el exceso de solución. Más tarde se aplicó la solución de revelado para la enzima peroxidasa vector VIP (Vector, Peterborough 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 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

ANTICUERPO	COMPAÑÍA (CÓDIGO)	DILUCIÓN	FIJADOR	ESPECIE	MICRO- ONDAS
Anti-P-mTOR	Cell signalling (2448)	1:50	Zinc	Conejo	Si: Citrato
Anti-P-Src	Cell signalling (2101)Tyr416	1:100	Zinc	Conejo	Si: EDTA
Anti- P-FAK Y397	Abcam Cambridge UK	1:100	Zinc	Conejo	Si: Tris
Anti-P-FAK (Y925)	Bioworld, Minneapolis, USA	1:100	Zinc	Conejo	Si: Tris

Tabla 4. Características de los anticuerpos utilizados en la experimentación

Las preparaciones de inmunohistoquímica fueron observadas en un microscopio automatizado Axioplan 2ie (Zeiss, Oberkochen, Germany) conectado a una cámara Zeiss Axio Cam ICc3, mediante *software* Meta-Morph (Molecular Devices, Downing-town, PA). Se analizaron mediante 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), calculada usando el programa informático de análisis de imágenes Matlab (The MathWorks Inc, Natick, NA, USA).

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).

9. Técnica TUNEL

Para evaluar los mecanismos de apoptosis, después de la inyección de IgG-SN y de IgG-PV con o sin pretratamiento con inhibidor de FAK, las muestras de piel de los ratones fueron introducidas 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 sustrato 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 usando el programa informático de análisis de imágenes Meta-Morph anteriormente comentado.

10. Medida de la actividad enzimática de Caspasas-3 y -9

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que se activan en respuesta a estímulos apoptóticos. Reconocen un motivo de cuatro aminoácidos, siempre terminado en aspártico, que difieren entre los diferentes miembros de la familia, y que en el caso de la caspasa-3 es (Asp-Glu-Val-Asp) DEVD y en el de la caspasa-9 es Leu-Glu-His-Asp (LEHD).

Para detectar la actividad enzimática de las caspasas-3 y -9 se empleó el *Caspase-3 Activity Assay Colorimetric* (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) y el *Caspase-9 Activity Assay Colorimetric* (Calbiochem, Darmstadt, Germany) (Modol et al, 2011). Las biopsias de piel obtenidas de los ratones previamente tratados con los inhibidores se resuspendieron en un *buffer* de lisis (*buffer* de lisis del *kit* de caspasa-3 o caspasa-9) y se homogenizaron por sonicación. Tras una centrifugación de 15 minutos a 13000 rpm a 4 °C obtuvimos las muestras para la realización de los *kits*. El ensayo se basa en la detección colorimétrica de la molécula p-nitroanilida (pNA) como resultado de la hidrólisis del péptido sustrato acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) por la caspasa-3 midiéndose y la hidrólisis del péptido sustrato acetil-Leu-Glu-His-Asp p-nitroanilida (Ac-LEHD-pNA) por

la caspasa-9. La pNA se cuantificó mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

La absorbancia emitida por las muestras de ratones tratados con IgG-SN se comparó con la absorbancia de las muestras de ratones tratados con IgG-PV para poder determinar el porcentaje de incremento de la actividad de la caspasas-3 y -9.

Para realizar el ensayo se utilizó 100 µg de proteína obtenida previamente de las biopsias de los ratones. Después de los tratamientos se siguieron las instrucciones del ensayo recomendadas por el fabricante.

11. Preparación de los lisados celulares y análisis mediante *Western blot*

Las proteínas de la piel de los ratones se extrajeron de las biopsias por homogenización utilizando 150 µl por muestra de *buffer* de lisis (59 mM Tris-HCL pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 6 mM octilglicerina, 0,25% desoxicolate Na, 2 mM ortovandato, 1% tritón x-100, 1% coctel inhibidor de proteasa y 1 mM PMSF) y posteriormente fueron sometidas a sonicación.

La separación de las proteínas según su peso molecular se realizó mediante la técnica descrita por Laemmil (UK, 1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida discontinuos, de 0,75 mm de espesor (Acrilamida: N, N'-metilenbisacrilamida 37,5:1) al 12%. El tampón de electroforesis utilizado fue: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS con pH en torno a 8,3 no ajustado.

Se cargaron entre 30 y 60 µg de proteína total en cada calle. Para cargar las muestras en el gel se mezclaron con solución de carga 2X (125 mM Tris-HCL pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2 β-mercaptoetanol, 0,1% de azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. De este modo se desnaturalizaron las proteínas y se favoreció su unión a SDS (detergente aniónico que da forma homogénea y carga negativamente a las proteínas). La electroforesis se realizó a una intensidad constante de 80 mA en el gel de apilamiento superior y de 120 mA en el gel inferior (gel de separación), hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzará el extremo del gel.

Posteriormente para poder estimar el peso molecular de las proteínas detectadas y también como control de la transferencia, se utilizaron marcadores de peso molecular conocido (Prestained SDS-PAGE standards, Low Range, Bio-Rad Laboratories; Hercules).

Después de la electroforesis las proteínas se inmovilizaron en una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia electroforética húmeda. Finalizada la transferencia se bloquearon con BSA las membranas, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes a 4 °C (**tabla 5**) empleando la dilución recomendada en cada caso por el fabricante. Tras la incubación se lavaron las membranas tres veces con TBS-Tween y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG diluido 1:10.000 conjugado con peroxidasa.

Las bandas de proteínas inmunorreactivas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (Super Signal ULTRA Kit, Pierce). Para ello se incubó la membrana con una solución de peróxido de hidrógeno y un sustrato (luminol) que emite luz de longitud de onda de 428 nm al ser oxidado por la peroxidasa en presencia de fenoles que potencian la reacción. Seguidamente se expusieron las membranas a películas fotográficas sensibles a la luz ECL durante el tiempo necesario para registrar la señal.

La intensidad de las bandas detectadas se cuantificó utilizando un sistema de análisis de imagen, que integra la densidad óptica de todos los puntos en el área de la banda (Bio Rad).

Para realizar la inmunodetección de la proteína β -actina (40 kDa) en una membrana en la que previamente se había realizado una primera inmunodetección, primero se retiraron con BSA los anticuerpos unidos a la membrana para evitar interferencias entre las señales. Se añadió a la membrana la solución de *stripping* (re-Blot Plus Mild solution 10X, Millipore, Tamecula; California) dejándola 15 minutos a temperatura ambiente y agitación vigorosa. Seguidamente se hicieron dos lavados de 15 minutos cada uno de ellos con TBS-T, procediendo a bloquear la membrana con BSA dos horas. Antes de utilizar las membranas se confirmó la eliminación de los anticuerpos adsorbidos por reincubación con el anticuerpo secundario (anti-IgG) y posterior revelado

ANTICUERPO	COMPAÑIA	DILUCIÓN	FIJADOR	ESPECIES
Anti-Bax	Cell signalling	1:1000	Monoclonal	(H, M, R)
Anti- Bcl-2	Cell signalling	1:500	Monoclonal	(H, M, R)
Anti- β -Actina	Sigma	1:10000	Policlonal	(H, M)

Tabla 5. Características de los anticuerpos primarios utilizados en la realización del *Western blot*

12. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa informático SPSS para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) y analizados mediante test no paramétrico Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. La significación estadística ($p < 0,05$) se estableció entre dos grupos utilizando el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

IV.-RESULTADOS

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

En primer lugar quisimos comprobar si la inyección de fracciones de IgG obtenidas de los sueros de pacientes con PV cutáneo-mucoso utilizados en nuestro estudio reproducían en el ratón la enfermedad clínicamente, y si a nivel histológico se observaban tanto hallazgos de acantólisis como de apoptosis. De esta manera nuestro modelo animal sería adecuado para estudiar mecanismos implicados en el PV.

1. 1. Administración de fracciones IgG de suero control

Doce horas después de la inyección de IgG-SN no se observó enfermedad clínica (signo de Nikolsky negativo) ni histológica (no se encontró acantólisis ni células TUNEL positivas en la capa basal de la epidermis) en los 3 ratones estudiados (**Figura 27**) (**Pág. 99**) (**Tabla 6**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	
		Acantólisis	Células TUNEL
SN ₁	-	-	-
SN ₂	-	-	-
SN ₃	-	-	-

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

1. 2. Administración de fracciones IgG de suero de pacientes con PV

La enfermedad se observó a las 12 horas en todos los ratones a los que se administró la IgG-PV, tanto desde el punto de vista clínico como histológico. Todos los ratones presentaban el signo de Nikolsky (+++/+++). En el estudio histopatológico se detectó acantólisis suprabasal en todas las muestras (+++/+++) y células TUNEL positivas en la capa basal de la epidermis (**Figura 30**) (**Pág. 107**) (**Tabla 7**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	
		Acantólisis	Células TUNEL
PV _{1,1}	+++	+++	+
PV _{1,2}	+++	+++	+
PV _{1,3}	+++	+++	+
PV _{2,1}	+++	+++	+
PV _{2,2}	+++	+++	+
PV _{2,3}	+++	+++	+
PV _{3,1}	+++	+++	+
PV _{3,2}	+++	+++	+
PV _{3,3}	+++	+++	+

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

2. Estudio de la expresión de la FAK en su forma fosforilada en los residuos tirosina 397 y 925 en las lesiones de PV de los ratones tratados con fracciones de PV-IgG

Primero quisimos saber si la FAK activada tenía un papel en el desarrollo de PV. Por ello estudiamos la presencia de FAK fosforilada en los residuos tirosina 397/925 de las muestras de tejidos obtenidas de los ratones inyectados con IgG-SN y con IgG-PV.

Observamos que las muestras de los ratones tratados con IgG-SN mostraban P-FAK (Y397/925) en las células basales de la epidermis con un patrón de membrana plasmática, permitiendo ver un halo blanco alrededor del núcleo (**Figura 28**) (**Pág. 101**) (**Tabla 8**).

Las preparaciones de los ratones tratados con IgG-PV mostraron P-FAK (Y397/925) tiñéndose el citoplasma de las células basales de la epidermis de manera uniforme, sólo en las áreas de acantólisis (**Figura 28**) (**Tabla 8**). Las zonas perilesionales mostraban un patrón de membrana de la P-FAK.

Cuando realizamos un análisis semi-cuantitativo de la expresión de los niveles de P-FAK (Y397/925), comparando la expresión tras la inyección con IgG-PV respecto a la administración de IgG-SN, observamos un incremento estadísticamente significativo de los niveles de P-FAK (Y397/925) ($p < 0.001$) (**Gráfico 1**) (**Pág. 105**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	
		Acantólisis	P-FAK (Y397/925)
SN ₁	-	-	Patrón membrana
SN ₂	-	-	Patrón membrana
SN ₃	-	-	Patrón membrana
PV _{1.1}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{1.2}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{1.3}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{2.1}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{2.2}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{2.3}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{3.1}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{3.2}	+	+++	Patrón citoplasmático
PV _{3.3}	+	+++	Patrón citoplasmático

Tabla 8. Expresión de P-FAK (Y397/925) tras la administración de IgG-SN y de IgG-PV en los ratones C57

3. Estudio de la inhibición de la acantólisis suprabasal de la epidermis y de la apoptosis, mediante técnica TUNEL, en los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV

Para averiguar si la FAK podía contribuir al desarrollo de las lesiones de PV en nuestro modelo animal decidimos administrar un inhibidor de la actividad de FAK antes de la inyección de IgG-PV, y comparar los resultados con los observados cuando a los ratones se les inyectaba solamente IgG-SN o IgG-PV.

Todos los ratones pretratados con PF-573,228 (FI) y a los que posteriormente se les inyectó IgG-PV no presentaron ni hallazgos clínicos ni histológicos de PV (**Figura 29**) (**Pág. 103**) (**Figura 30**) (**Pág. 107**) (**Tabla 9**). Resultó interesante observar cómo las células TUNEL positivas de la capa basal de la epidermis de los ratones pretratados con el inhibidor de FAK mostraban una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (**Gráfico 2**) comparada con las encontradas tras la inyección única de IgG-PV.

.RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA Acantólisis	Células TUNEL
FI _{pv1.1}	-	-	+/-
FI _{pv1.2}	-	-	+/-
FI _{pv1.3}	-	-	+/-
FI _{pv2.1}	-	-	+/-
FI _{pv2.2}	-	-	+/-
FI _{pv2.3}	-	-	+/-
FI _{pv3.1}	-	-	+/-
FI _{pv3.2}	-	-	+/-
FI _{pv3.3}	-	-	+/-

Tabla 9. Hallazgos clínicos e histopatológicos en los ratones C57 tras pretratamiento con inhibidor de FAK e inyección de fracciones de IgG-PV

4. El pretratamiento de los ratones con inhibidores de Src, mTOR, isoformas HER y caspasas e inyección posterior de fracciones de IgG-PV disminuye la expresión de FAK fosforilada en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de la epidermis

Quisimos valorar cómo era la relación entre la FAK y diferentes vías de señalización molecular implicadas en el desarrollo de la enfermedad en los ratones. Para ello estudiamos la expresión de P-FAK (Y397/925) en las muestras obtenidas de los ratones que habían sido pretratados con inhibidores de moléculas implicadas en vías de señalización intracelular en el PV antes de inyectarles fracciones de IgG-PV.

Los inhibidores que administramos fueron: PP1, rapamicina, CL y PCI. Para control empleamos 9 ratones a los que inyectamos fracciones de IgG-PV de los tres sueros empleados en el estudio y 3 a los que inyectamos fracciones de IgG-SN.

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

Para determinar si la FAK se relacionaba con la Src pretratamos a los ratones con PP1 (inhibidor de Src) previo a la inyección de fracciones de IgG-PV.

Los ratones pretratados con PP1 e inyectados después con fracciones de IgG-PV no presentaron ni la enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 10**). Observamos una expresión en patrón de membrana de P-FAK en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de la epidermis de las muestras obtenidas de estos ratones (**Figura 31**) (**Pág. 109**).

RATÓN	ENFERMEDAD		ENFERMEDAD HISTOLÓGICA
	CLÍNICA	Acantólisis	P-FAK (Y397/925)
PP1 _{pv1.1}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv1.2}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv1.3}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv2.1}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv2.2}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv2.3}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv3.1}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv3.2}	-	-	Patrón de mb
PP1 _{pv3.3}	-	-	Patrón de mb

Tabla 10. Hallazgos tras la administración de fracciones de IgG-PV en ratones pretratados con PP1

En los estudios de inmunohistoquímica pudimos apreciar una disminución de niveles de FAK fosforilada en los residuos tirosina 397/925 estadísticamente significativa ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) en la capa basal de los ratones pretratados con PP1 e inyección de IgG-PV respecto a los encontrados en las muestras de los ratones tratados sólo con IgG-PV (**Gráfico 1**) (**Pág. 105**).

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

Con el fin de determinar si la mTOR se relacionaba con la FAK en el proceso de desarrollo de PV en nuestro modelo experimental, decidimos pretratar a los ratones con rapamicina (inhibidor de mTOR) antes de inyectarles fracciones de IgG-PV y después analizar la expresión y los niveles de P-FAK en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de la epidermis de las muestras obtenidas.

Los ratones pretratados con rapamicina e inyectados posteriormente con fracciones de IgG-PV no desarrollaron la enfermedad ni clínica ni histológicamente (**Tabla 11**). Las muestras obtenidas mostraban una expresión de P-FAK en los residuos tirosina 397/925 en patrón de membrana en la capa basal de la epidermis, observándose un halo blanco alrededor de los núcleos de las células (**Figura 31**) (**Pág. 109**).

RATÓN	ENFERMEDAD	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	
	CLÍNICA	Acantólisis	P-FAK (Y397/925)
RP _{pv1.1}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv1.2}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv1.3}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv2.1}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv2.2}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv2.3}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv3.1}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv3.2}	-	-	Patrón de mb
RP _{pv3.3}	-	-	Patrón de mb

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

Además, en el análisis inmunohistoquímico encontramos una disminución en la expresión de niveles de P-FAK (Y397/925) estadísticamente significativas ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) en los ratones pretratados con rapamicina e inyección de IgG-PV respecto a los tratados únicamente con inyección de IgG-PV (**Gráfica 1**) (**Pág. 105**).

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

Para establecer la correlación entre la señalización de FAK y HER en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis en el PV, estudiamos el efecto del CL (inhibidor de isoformas HER), sobre los niveles de FAK fosforilada en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de la epidermis de las muestras obtenidas de los ratones pretratados con este inhibidor.

Los ratones pretratados con CL y a los que posteriormente se inyectó IgG-PV no presentaron la enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 12**). En ellos se observó una expresión de P-FAK (Y397/925) en patrón de membrana plasmática en las células basales de la epidermis (**Figura 31**) (**Pág. 109**), mostrando un halo blanco alrededor de los núcleos, exactamente el mismo que se observó después de la administración de IgG-SN (**Figura 31**).

RATÓN	ENFERMEDAD		ENFERMEDAD HISTOLÓGICA P-FAK (Y397/925)
	CLÍNICA	Acantólisis	
CL _{PV1.1}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV1.2}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV1.3}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV2.1}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV2.2}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV2.3}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV3.1}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV3.2}	-	-	Patrón de mb
CL _{PV3.3}	-	-	Patrón de mb

Tabla 12. Hallazgos tras la administración de fracciones de IgG-PV en ratones pretratados con CL

Se comprobó un importante y significativo descenso en la intensidad de la expresión de P-FAK (Y 397/925) ($p < 0.001$) en la capa basal de la epidermis de los ratones pretratados con CL respecto a los tratados con IgG-PV solamente (**Gráfica 1**) (**Pág. 105**).

4. 4. Pretratamiento con inhibidor de caspasas e inyección de fracciones de IgG-PV

Para determinar si la FAK se relacionaba con las caspasas en el proceso bioquímico de desarrollo de las lesiones de PV en nuestro modelo animal pretratamos a los ratones con PCI, un inhibidor de pan-caspasas, previo a la inyección de IgG-PV.

Los ratones pretratados con PCI e inyección posterior de fracciones de IgG-PV no presentaron ni la enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 13**). Observamos una expresión

en patrón de membrana de P-FAK (Y397/925) en la capa basal de la epidermis (**Figura 31**) (**Pág. 109**).

En los estudios de inmunohistoquímica pudimos apreciar una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de niveles de P-FAK en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de los ratones pretratados con PCI e inyección de fracciones de IgG-PV respecto a los ratones tratados únicamente con IgG-PV (**Gráfico 1**) (**Pág. 105**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA	
		Acantólisis	P-FAK (Y397/925)
PCI _{PV1.1}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV1.2}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV1.3}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV2.1}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV2.2}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV2.3}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV3.1}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV3.2}	-	-	Patrón de mb
PCI _{PV3.3}	-	-	Patrón de mb

Tabla 13. Hallazgos tras la administración de fracciones de IgG-PV en ratones pretratados con PCI

5. Inhibición de marcadores de apoptosis en las células basales de la epidermis en los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV

Quisimos averiguar como la FAK se relacionaba con marcadores de apoptosis. Para ello medimos varios parámetros de apoptosis en ratones que habían sido pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV

En los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección de IgG-PV, tras comprobar que no presentaban enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 14**) determinamos los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 en 9 de ellos mediante la realización de *Western blot* (**Figura 32**) (**Pág. 111**). En los otros 9, determinamos los niveles de la actividad de caspasas-3 y -9 mediante el *Caspase-3 Activity Assay Colorimetric* y *Caspase-9 Activity Assay Colorimetric*. Como controles empleamos 2 ratones a los que se inyectó sólo IgG-SN y 9 ratones a los que se inyectó IgG-PV.

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA Acantólisis	MEDICIONES REALIZADAS
FI _{pv1.1}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv1.2}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv1.3}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv1.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv1.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv1.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv2.1}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv2.2}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv2.3}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv2.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv2.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv2.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv3.1}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv3.2}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv3.3}	-	-	Bax/Bcl-2
FI _{pv3.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv3.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
FI _{pv3.6}	-	-	Caspasas-3 y -9

Tabla 14. Hallazgos clínicos e histopatológicos en los ratones C57 tras pretratamiento con inhibidor de FAK e inyección de fracciones de IgG-PV cuyas muestras se emplearon para medir parámetros de apoptosis

Los niveles de Bax y Bcl-2 en las muestras de los ratones tratados sólo con IgG-PV eran significativamente más altos y bajos ($p < 0.001$) respectivamente, comparados con los encontrados en los ratones que se les administró IgG-SN (**Gráfica 3A**) (**Pág. 111**).

Los niveles de Bax y Bcl-2 en las muestras de los ratones pretratados con inhibidor de FAK eran significativamente más bajos ($p < 0.01$) y altos ($p < 0.001$) respectivamente, comparados con los encontrados en los ratones tratados sólo con IgG-PV (**Gráfica 3A**).

Las actividades de caspasas-3 y -9 en las muestras de los ratones tratados con IgG-PV se compararon con los tratados con IgG-SN encontrándose significativamente más altas ($p < 0.001$). Se compararon también los resultados obtenidos en las muestras de los ratones que habían sido pretratados con inhibidor de FAK e inyección de IgG-PV con los de los que sólo recibieron IgG-PV. Se observó la desaparición del incremento de la actividad de caspasas-3 y -9 tras el tratamiento de los ratones con IgG-PV de manera estadísticamente significativa ($p < 0.001$) si los ratones eran pretratados con inhibidor de FAK (**Gráfica 3B**).

Los niveles de Bax y Bcl-2 y actividad caspasas-3 y -9 encontrados en los ratones a los que se les realizó pretratamiento con inhibidor de FAK fueron muy similares a los obtenidos tras inyectar sólo IgG-SN (**Gráfica 3**).

6. Inhibición de marcadores de apoptosis en las células basales de la epidermis en los ratones pretratados con inhibidores de Src, mTOR e isosformas HER previo a la inyección de fracciones de IgG-PV

Basándonos en trabajos previos de nuestro grupo de investigación donde observamos como la Src, la mTOR y las isoformas HER contribuían al desarrollo de la acantólisis en el PV, quisimos estudiar cómo influían sobre marcadores de apoptosis. Por ello determinamos parámetros de apoptosis como son los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 y actividad de caspasa-3 y -9 (**Figura 32**) (**Pág. 111**) (**Gráfico 3**) (**Pág. 111**).

Se emplearon los mismos controles que en el experimento anterior (**Apartado 5**) en los que se les había medido los niveles de expresión Bax y Bcl-2, así como la actividad de caspasas-3 y -9.

6. 1. Pretratamiento con PP1 e inyección de fracciones de IgG-PV

En los ratones pretratados con inhibidor de Src (PP1) e inyección de fracciones de IgG-PV, tras comprobar que no presentaban enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 15**), determinamos en 9 de ellos los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 y en los otros 9 la actividad de caspasas-3 y -9.

Los niveles de Bax y Bcl-2 en los ratones pretratados con inhibidor de Src eran significativamente más bajos y altos ($p < 0.001$) respectivamente, comparados con los encontrados en los tratados sólo con inyección de fracciones de IgG-PV (**Gráfica 3A**) (**Pág. 111**).

Se observó la desaparición del incremento de la actividad de caspasas-3 y -9 tras el tratamiento de los ratones con IgG-PV de manera estadísticamente significativa ($p < 0.01$) si los ratones eran pretratados con PP1 (**Gráfica 3B**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA Acantólisis	MEDICIONES REALIZADAS
PP1 _{pv1.1}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv1.2}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv1.3}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv1.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv1.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv1.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv2.1}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv2.2}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv2.3}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv2.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv2.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv2.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv3.1}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv3.2}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv3.3}	-	-	Bax/Bcl-2
PP1 _{pv3.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv3.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
PP1 _{pv3.6}	-	-	Caspasas-3 y -9

Tabla 15. Hallazgos clínicos e histopatológicos en los ratones C57 tras pretratamiento con inhibidor de Src e inyección de fracciones de IgG-PV cuyas muestras se emplearon para medir parámetros de apoptosis

Los resultados de los niveles de Bax y Bcl-2 y actividad caspasas-3 y -9 encontrados en las muestras de los ratones a los que se les realizó pretratamiento con inhibidor de Src fueron prácticamente los mismos que se obtuvieron tras inyectar sólo IgG-SN.

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

Tras realizar el pretratamiento con inhibidor de mTOR (rapamicina) e inyección posterior de fracciones de IgG-PV en 18 ratones, y comprobar que no presentaban enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 16**) determinamos en 9 de ellos los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 y en los otros 9 la actividad de caspasas-3 y -9.

Los niveles de Bax y Bcl-2 en las muestras de los ratones pretratados con inhibidor de mTOR eran significativamente más bajos y altos ($p < 0.001$) respectivamente, en relación con los encontrados en los tratados solamente con IgG-PV (**Gráfica 3A**) (**Pág. 111**).

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA Acantólisis	MEDICIONES REALIZADAS
RP _{pv1.1}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv1.2}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv1.3}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv1.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv1.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv1.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv2.1}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv2.2}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv2.3}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv2.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv2.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv2.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv3.1}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv3.2}	-	-	Bax/Bcl-2
PR _{pv3.3}	-	-	Bax/Bcl-2
RP _{pv3.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv3.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
RP _{pv3.6}	-	-	Caspasas-3 y -9

Tabla 16. Hallazgos clínicos e histopatológicos en los ratones C57 tras pretratamiento con inhibidor de mTOR e inyección de fracciones de IgG-PV cuyas muestras se utilizaron para medir parámetros de apoptosis

Los resultados obtenidos de la actividad de caspasas-3 y -9 en los ratones pretratados con inhibidor de mTOR e inyección posterior de IgG-PV mostraron un incremento de la actividad estadísticamente significativo ($p < 0,01$), comparada con la encontrada en las muestras de los que solamente se les administró IgG-PV (**Gráfica 3B**).

Observamos que los resultados de los niveles de Bax y Bcl-2 y actividad caspasas-3 y -9 obtenidos en los ratones a los que se les realizó pretratamiento con inhibidor de mTOR eran similares a los mostrados en los ratones que sólo fueron inyectados con IgG-SN.

6. 3. Pretratamiento con CL e inyección de fracciones de IgG-PV

Después de comprobar que los ratones pretratados con inhibidor de isoformas HER (CL) e inyectados después con fracciones de IgG-PV no presentaban enfermedad clínica ni histológica (**Tabla 17**), determinamos en 9 de ellos los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 y en los otros 9 los niveles de la actividad de caspasas-3 y -9.

RATÓN	ENFERMEDAD CLÍNICA	ENFERMEDAD HISTOLÓGICA Acantólisis	MEDICIONES REALIZADAS
CL _{pv1.1}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv1.2}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv1.3}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv1.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv1.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv1.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv2.1}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv2.2}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv2.3}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv2.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv2.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv2.6}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv3.1}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv3.2}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv3.3}	-	-	Bax/Bcl-2
CL _{pv3.4}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv3.5}	-	-	Caspasas-3 y -9
CL _{pv3.6}	-	-	Caspasas-3 y -9

Tabla 17. Hallazgos clínicos e histopatológicos en los ratones C57 tras pretratamiento con inhibidor de isoformas HER e inyección de fracciones de IgG-PV cuyas muestras se emplearon para medir parámetros de apoptosis

En este experimento comparamos los resultados obtenidos en los ratones pretratados con inhibidor de isoformas HER e inyección de IgG-PV respecto a los que solamente recibieron IgG-PV. Los niveles de Bax y Bcl-2 en los ratones pretratados con CL eran significativamente más bajos ($p < 0.01$) y altos ($p < 0.001$) respectivamente, que los encontrados en los ratones tratados sólo con IgG-PV (**Gráfica 3A**) (**Pág. 111**).

Se observó la desaparición del incremento de la actividad de caspasas-3 y -9 tras el tratamiento de los ratones con IgG-PV de manera estadísticamente significativa ($p < 0.01$) si los ratones eran pretratados con CL (**Gráfica 3B**).

Los valores de los niveles de Bax y Bcl-2 y de actividad caspasas-3 y -9 en los ratones pretratados con CL eran prácticamente los mismos que los encontrados en aquellos que solamente fueron inyectados con IgG-SN.

7. Los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de fracciones de IgG-PV muestran una disminución de la expresión de P-mTOR y P-Src en las células basales de la epidermis

En este trabajo quisimos investigar si la mTOR y la Src estaban reguladas por la FAK. Para ello determinamos mediante inmunohistoquímica los niveles de P-mTOR y P-Src en las células de la capa basal de la epidermis en los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección de fracciones de IgG-PV (**Figura 33**) (**Pág. 113**). Los resultados los comparamos con los obtenidos en las muestras de los ratones a los que se les inyectó sólo IgG-SN o sólo IgG-PV. Empleamos muestras de los ratones utilizados en el experimento 2 (**Apartado 2**). Como control se emplearon preparaciones obtenidas de los 3 ratones a los que se inyectó sólo IgG-SN y de los 9 ratones a los que se inyectó IgG-PV, todos ellos utilizados en el experimento 4 (**Apartado 4**). En estos controles determinamos mediante inmunohistoquímica los niveles de P-Src y P-mTOR en las células de la capa basal de la epidermis.

Observamos una elevación tanto de los niveles de P-mTOR como de los de P-Src, estadísticamente significativa ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente) en la capa basal de los ratones tratados con IgG-PV respecto a los que se les inyectó IgG-SN (**Gráfica 4**) (**Pág.115**).

Además apreciamos una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de los niveles de P-mTOR y de P-Src, en la capa basal de los ratones pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de IgG-PV respecto a los que sólo se les inyectó IgG-PV (**Gráfica 4**).

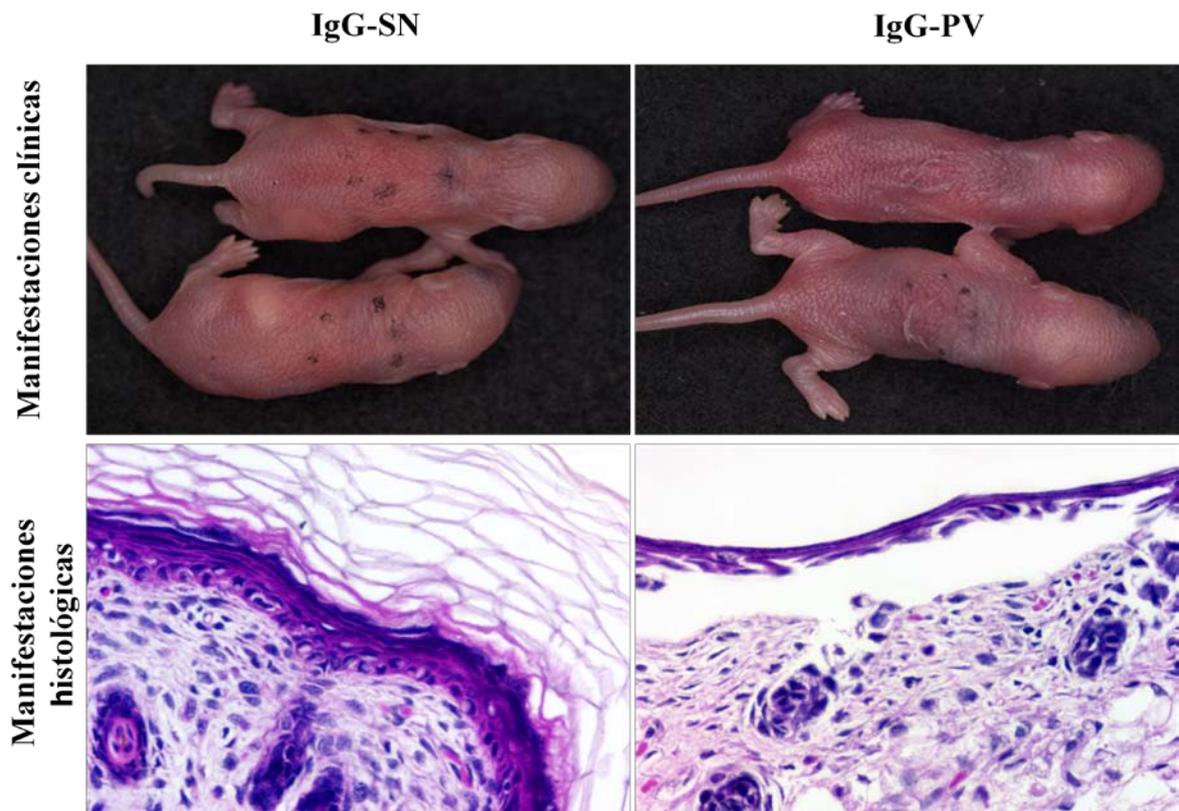


Figura 27. Hallazgos clínicos e histológicos tras la inyección de IgG-SN e IgG-PV. No hay signos de enfermedad clínica ni histológica tras la administración de IgG-SN. Existen signos de enfermedad clínica e histológica después de la inyección de IgG-PV

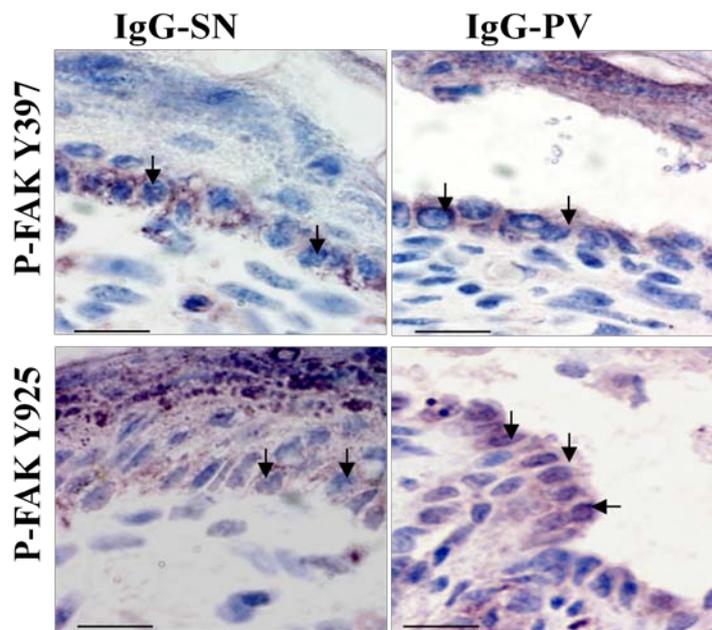


Figura 28. Expresión de P-FAK (Y397/925) en la capa basal de epidermis. En las preparaciones obtenidas de los ratones tratados con IgG-SN se observa un patrón de membrana de P-FAK, mientras que en las muestras de los que reciben IgG-PV presentan un patrón difuso de P-FAK en el citoplasma

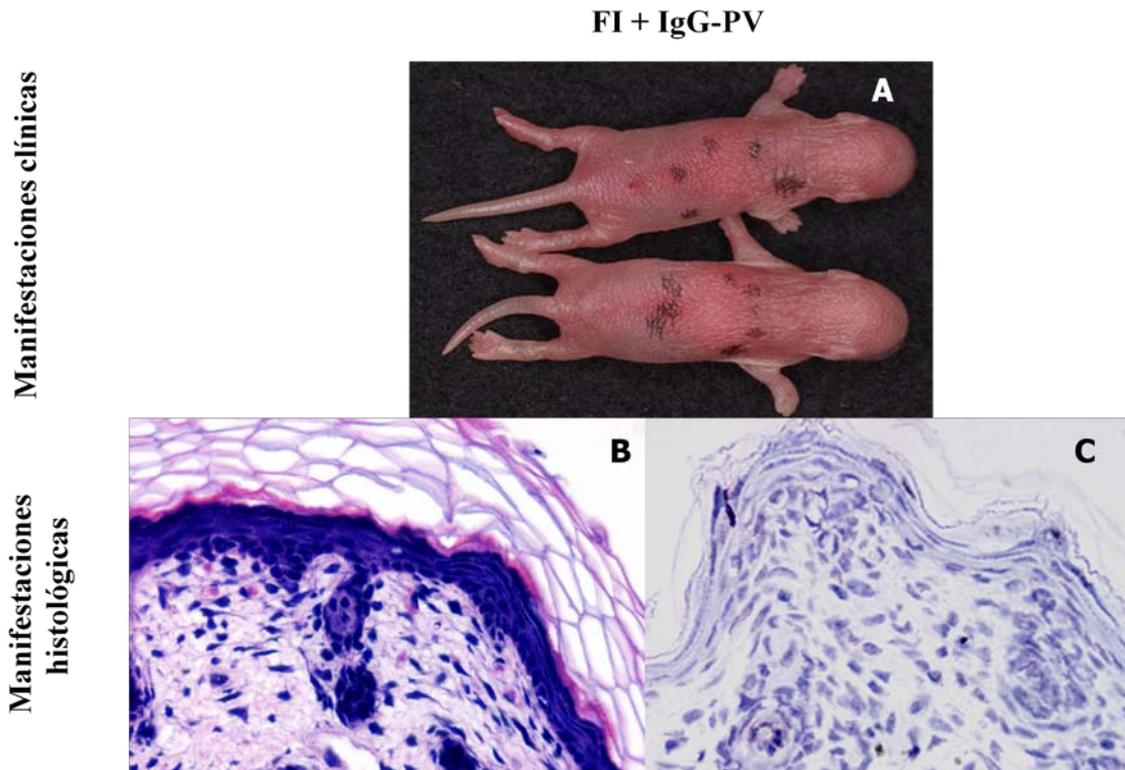
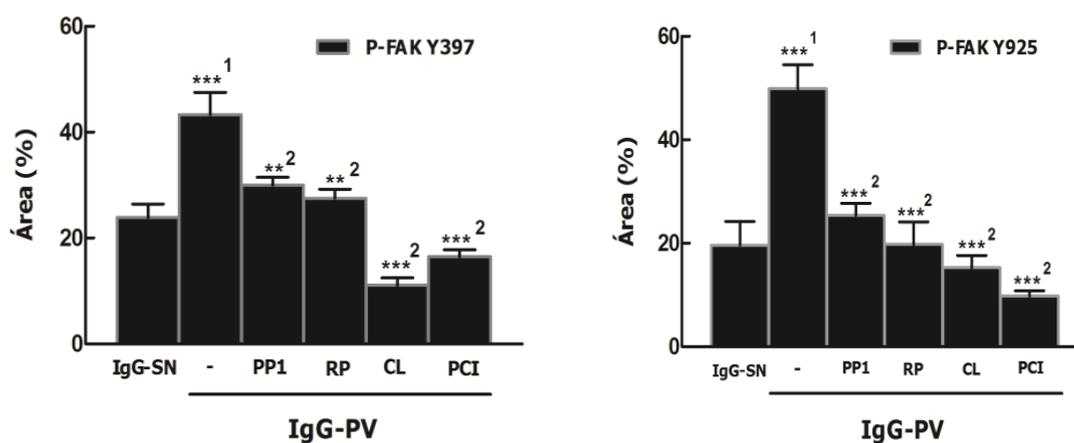


Figura 29: Hallazgos clínicos e histológicos tras pretratamiento con inhibidor de FAK e inyección de fracciones de IgG-PV. Cuando los ratones fueron pretratados con inhibidor de FAK (**FI-573,228**) antes de la inyección de IgG-PV, no se observaron manifestaciones clínicas ni histológicas de la enfermedad (B); las células TUNEL positivas fueron escasas (C)



Gráfica 1. Cuantificación del análisis inmunohistoquímico de la expresión de P-FAK (Y397/925) en la capa basal de epidermis tras tratamiento con fracciones de IgG-SN, IgG-PV y pretratamiento con inhibidores de Src, mTOR, isoformas HER y caspasas e inyección posterior de fracciones de IgG-PV. La P-FAK (Y397/925) muestra una elevación de los niveles estadísticamente significativa en las muestras de los ratones tratados con IgG-PV respecto a los determinados en las muestras de los ratones a los que solamente se les administró fracciones de IgG-SN (1). La P-FAK (Y397/925) muestra una disminución de los niveles, estadísticamente significativa, en las muestras de los ratones pretratados con inhibidores de Src, mTOR, isoformas HER o caspasas e inyección de IgG-PV, respecto a los detectados en las muestras de los que solamente se les administró IgG-PV (2) ** p<0.01 * p<0.001**

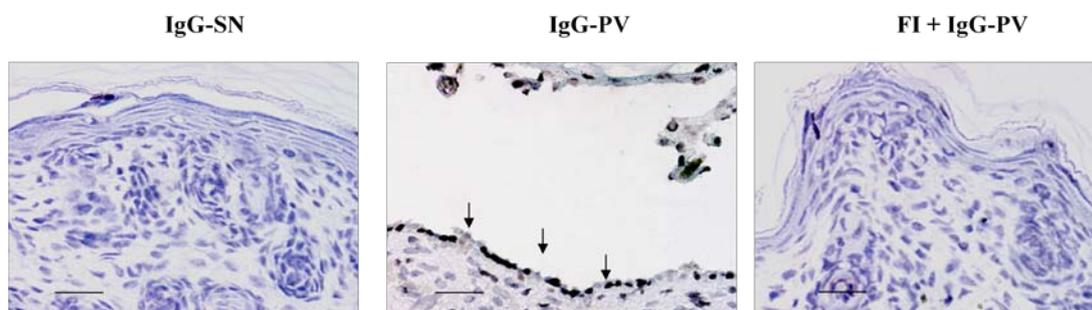
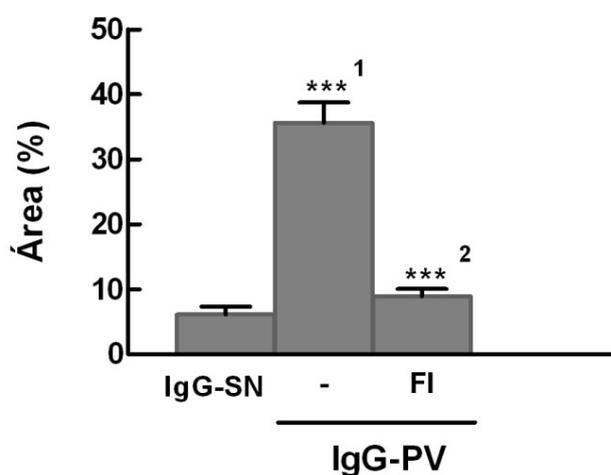


Figura 30. Estudio de la apoptosis mediante la técnica TUNEL en la capa basal de la epidermis en los ratones tratados con fracciones de IgG-SN, IgG-PV y en los pretratados con inhibidor de FAK e inyección posterior de IgG-PV. Doce horas después de la inyección de IgG-SN no se observaron células apoptóticas. Tras la administración de IgG-PV a los ratones observamos un aumento de las células TUNEL positivas en la capa basal. Los ratones que fueron pretratados con un inhibidor de FAK mostraron una disminución casi completa de las células TUNEL positivas en la capa basal



Gráfica 2. Cuantificación de las células TUNEL positivas en la capa basal. 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 (1). Después del pretratamiento de los ratones con inhibidor de FAK e inyección de fracciones de IgG-PV apreciamos un descenso estadísticamente significativo de las células apoptóticas, respecto a los resultados obtenidos tras la administración única de IgG-PV (2) *** $p < 0.001$

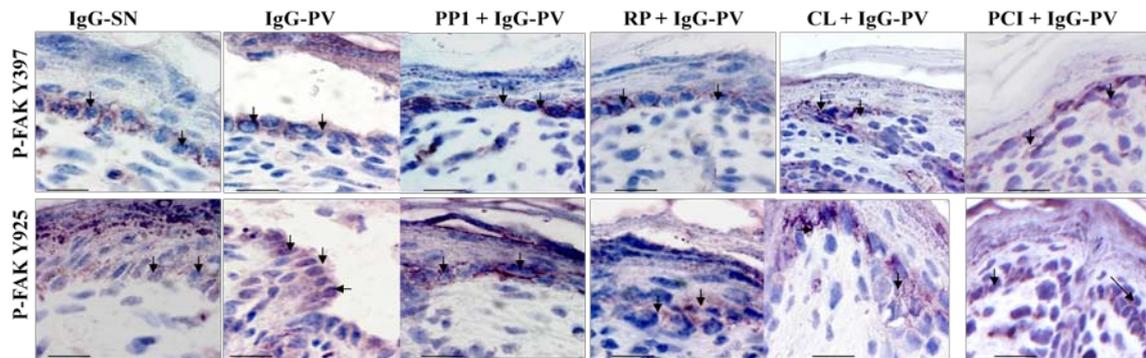


Figura 31. Hallazgos del estudio inmunohistoquímico de la expresión de P-FAK en los residuos tirosina 397/925 en la capa basal de epidermis tras administración de IgG-SN, IgG-PV y tras pretratamiento de los ratones con inhibidores de Src (PP1), mTOR (RP), isoformas HER (CL) y caspasas (PCI) e inyección posterior de fracciones de IgG-PV. Las muestras de los ratones tratados con IgG-SN muestran un patrón de membrana, mientras que las de los ratones que sólo reciben IgG-PV tienen un patrón difuso en el citoplasma. Las preparaciones obtenidas de los ratones que habían sido pretratados con inhibidor de Src (PP1) o de mTOR (RP) o de isoformas HER (CL) o de caspasas (PCI) e inyección de fracciones de IgG-PV mostraban una expresión en patrón de membrana en la capa basal de la epidermis de P-FAK en los residuos tirosina 397/925

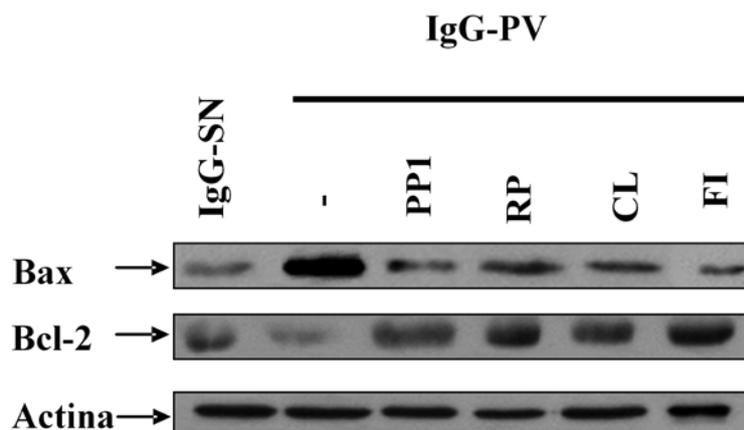
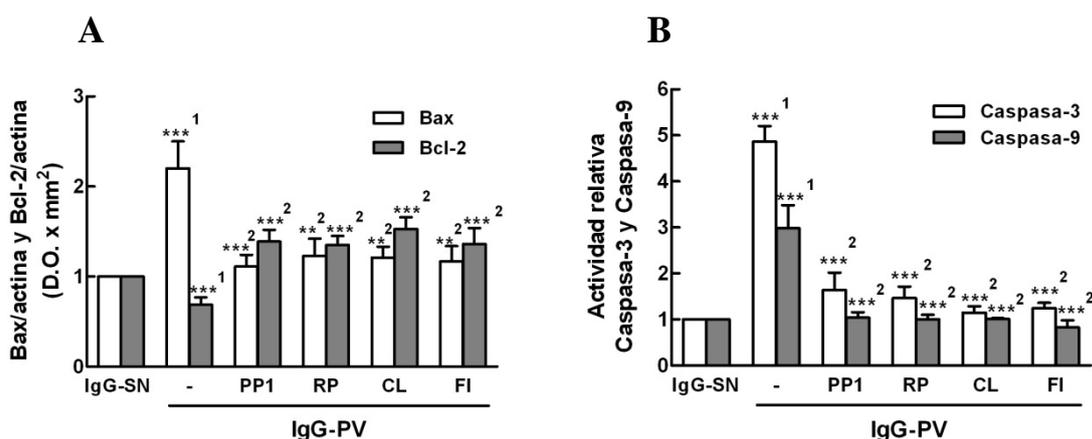


Figura 32. Niveles de Bax y Bcl-2 determinados mediante *Western blot* en los ratones tratados con IgG-SN, IgG-PV y pretratados con inhibidores de Src (PP1), mTOR (RP), isoformas HER (CL) y FAK (FI) e inyección de fracciones de IgG-PV



Gráfica 3. Cuantificación de los *blots* de Bax/Bcl-2 así como de la actividad de caspasas-3 y -9 en los ratones tratados con IgG-PV respecto a los tratados con IgG-SN y en los pretratados con inhibidores de Src (PP1), mTOR (RP), isoformas HER (CL) y FAK (FI) e inyección posterior de fracciones de IgG-PV. Los niveles de Bax y Bcl-2 en los ratones tratados solo con IgG-PV era significativamente más altos y bajos ($p < 0.001$) respectivamente, comparados con los encontrados en los ratones que se les administró IgG-SN (1) (A). La actividad de caspasas-3 y -9 en los ratones tratados con IgG-PV era significativamente más alta ($p < 0.001$) que en los tratados con IgG-SN (1) (B). Los niveles de Bax y Bcl-2 en los ratones tratados con inhibidores e inyección de IgG-PV eran significativamente más bajos y altos ($p < 0.01$ y $p < 0,001$) respectivamente, comparados con los encontrados en los ratones tratados con IgG-PV (2) (A). El incremento de la actividad de caspasas-3 y -9 tras el tratamiento de los ratones con IgG-PV no se observó si los ratones eran pretratados con inhibidores (2)(B) ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

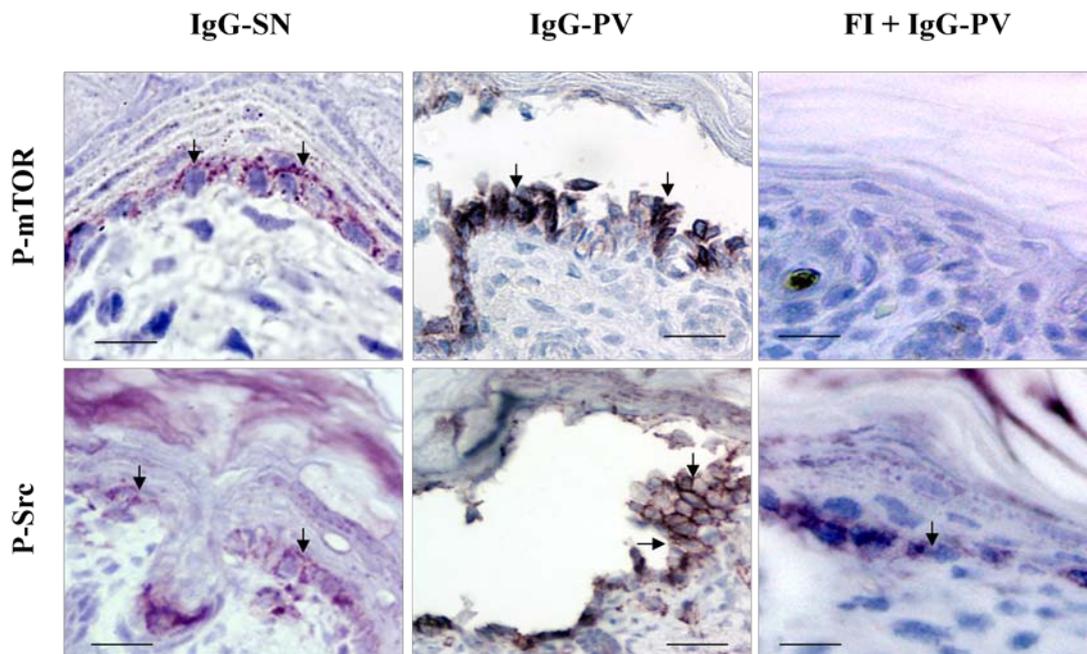
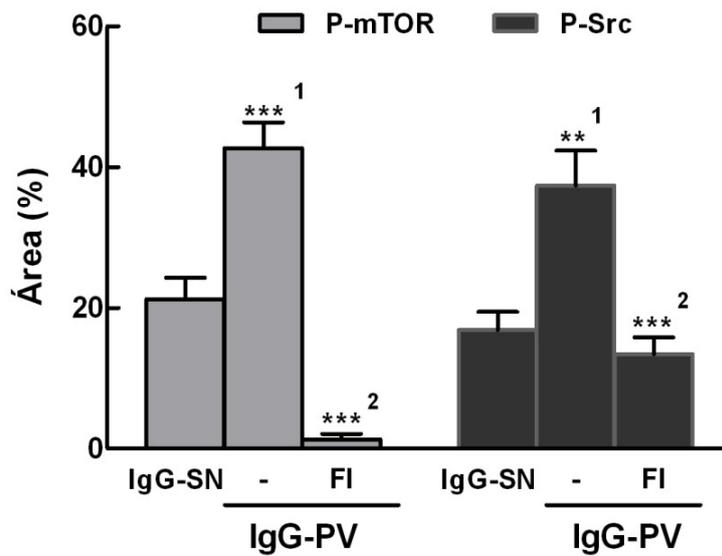


Figura 33. Hallazgos del estudio inmunohistoquímico de la expresión de P-mTOR y P-Src tras la inyección de fracciones de IgG-SN, IgG-PV e inhibidor de FAK junto con fracciones de IgG-PV. La muestras de los ratones tratados con IgG-SN mostraron una ligera expresión de P-mTOR y P-Src en la capa basal de la epidermis. Los tratados con inyección de IgG-PV presentaron un aumento de la expresión de P-mTOR y P-Src en la capa basal de la epidermis. Cuando a los ratones se les administró inhibidor de FAK previo a la inyección de IgG-PV esta expresión disminuyó



Gráfica 4. Cuantificación del análisis inmunohistoquímico de la expresión de P-mTOR y P-Src en la capa basal de epidermis. Los niveles de expresión de P-mTOR y P-Src en las muestras de los ratones tratados con IgG-PV mostraron una elevación estadísticamente significativa respecto a los detectados en las muestras de los ratones que reciben IgG-SN (1). Tras pretratamiento con inhibidor de FAK e inyección de IgG-PV, la expresión de P-mTOR y P-Src muestra una disminución estadísticamente significativa respecto a la obtenida en las muestras de los ratones que sólo reciben IgG-PV (2) ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

V.- DISCUSIÓN

Desde la primera descripción de Schimtz y Michel en 1976 (Schiltz and Michel, 1976) del papel de la IgG en las lesiones de PV, muchos trabajos han confirmado este hallazgo. Su acción es necesaria para que se produzca la acantólisis; tras su unión a proteínas de membranas (Dsg y otros antígenos) se desencadenan múltiples vías de señalización intracelular que permiten la ruptura entre los queratinocitos. Esta separación intercelular no se lleva a cabo de una forma anárquica, como ocurre en otras enfermedades ampollosas (como por ejemplo. en las infecciones herpéticas), sino que se realiza selectivamente por encima de la capa basal (acantólisis suprabasal).

En nuestro Departamento de Dermatología, fruto de una estrecha colaboración durante varios años con el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Navarra, hemos llevado a cabo varios proyectos de investigación encaminados a esclarecer los mecanismos que están implicados en la acantólisis del PV. Estos trabajos se han desarrollado dentro de la Unidad de Enfermedades Ampollosas de la Clínica Universidad de Navarra. En un primer momento observamos el papel relevante que tienen ciertas tirosinas quinasas, como la Src, en las lesiones de PV, contribuyendo a la fosforilación de proteínas claves en la adhesión de los queratinocitos (Sánchez-Carpintero et al, 2004). Posteriormente, observamos que acompañando al fenómeno de acantólisis, se activa en cultivos de queratinocitos la vía de la apoptosis incluyendo la actividad de caspasas, llegando a producirse fragmentación del DNA de las células (Pelacho et al, 2004), confirmando algunos resultados que entonces se habían publicado. En otros estudios pusimos de manifiesto que además, durante el proceso de separación entre los queratinocitos que se produce en esta enfermedad, tenía lugar un aumento de actividad óxido nítrico sintasa. La producción de óxido nítrico, principalmente mediante la isoforma neural de la NOS (nNOS), es un proceso clave para que la acantólisis en el PV se produzca, al menos en el modelo murino de la enfermedad utilizado en nuestro estudio (Marquina et al, 2008). Finalmente, y como continuación de los proyectos comentados, hemos podido confirmar que durante el proceso de acantólisis se ponen en marcha varias vías de señalización intracelular en los queratinocitos, selectivamente en la capa basal; la activación de la vía de los HER induce un incremento de la actividad de mTOR, Src y caspasas, siendo necesario esto para que finalmente la acantólisis se produzca.

En el proyecto presente, continuación de los anteriores, hemos querido profundizar en los mecanismos que pueden participar tanto en la acantólisis como en la apoptosis que

aparece en el PV, estudiando la acción de ciertas quinasas como las isoformas HER, Src, mTOR y FAK.

1. Experimentos de transferencia pasiva del pénfigo vulgar en un modelo murino

Desde hace treinta años, el modelo *in vivo* murino se emplea con gran eficacia para el estudio de los mecanismos que operan en el PV (Anhalt et al, 1982). La razón es la semejanza que existe entre las proteínas humanas y murinas que constituyen los desmosomas, y en concreto entre las desmogleínas. Así, mediante estudios de inmunohistoquímica, se ha puesto de manifiesto la presencia de Dsg 1 en todo el espesor de la epidermis del ratón, aunque de forma más importante en las capas más superficiales. Por el contrario, la Dsg 3 se expresa de forma exclusiva en las células de la capa basal y suprabasal de la epidermis (Mahoney et al, 1999). Estos hallazgos en la distribución de la Dsg son superponibles a los encontrados en la piel del ser humano adulto (Amagai et al, 1996). Así se ha podido reproducir la enfermedad tanto desde el punto de vista clínico, inmunológico e histopatológico (Takahashi et al, 1985) administrando de forma pasiva IgG purificada de pacientes con PV en fase activa a ratones recién nacidos e incluso a ratones adultos (Schulze et al, 2012). Por todo ello, son muchos los grupos de investigación en PV que han empleado este modelo para estudiar la patogénesis de la enfermedad, permitiendo después extrapolar los resultados al paciente.

Otro hecho que es importante resaltar es que los modelos *in vivo* se adecuan más a la realidad que los modelos *in vitro*, ya que en los primeros existe una actuación coordinada de múltiples factores que no se pueden establecer *in vitro*, como por ejemplo la acción del sistema inmunológico propio del ratón, o la acción de ciertas proteasas procedentes de los fibroblastos de la dermis.

Por todo esto, en el presente trabajo hemos continuado utilizando un modelo *in vivo* murino, al igual que en nuestros estudios anteriores (Sánchez-Carpintero et al, 2004; Marquina et al, 2008; Pretel et al, 2009).

Hemos empleado ratones C57 recién nacidos de pocas horas con un peso comprendido entre 1.5 y 1.9 gramos. De esta forma hemos podido utilizar dosis muy bajas de IgG purificada y realizar una mejor evaluación clínica de la enfermedad al carecer los animales de pelo.

Los estudios los realizamos por triplicado para poder confirmar nuestros resultados y analizarlos estadísticamente.

Los sueros de pacientes con PV empleados correspondían a aquellos que tenían enfermedad cutáneo-mucosa. 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 cutánea 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 animal (Amagai et al, 1994). Así, utilizamos en nuestro modelo IgG procedente de pacientes que no solamente cumplían los criterios de PV (Sánchez-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 Dsg 1 y Dsg 3 (Ding et al, 1997), detectados mediante ELISA. Además mediante *immunoblotting* observamos que los sueros utilizados mostraban las típicas bandas frente a Dsg 1 y Dsg 3. Estos hallazgos confirmaron que los sueros empleados eran adecuados para realizar el estudio que deseábamos llevar a cabo.

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, así como de los distintos inhibidores empleados. En segundo lugar, los inhibidores que queríamos administrar eran más manejables por vía local que sistémica, evitando además en los ratones los efectos adversos generalizados 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 o incluso por la pérdida parcial de cierto volumen de los compuestos a través del orificio de punción. Este hecho lo solventamos en nuestro modelo marcando con precisión en el ratón el lugar de cada una de las inyecciones. Por todo lo expuesto, 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 intradérmica cuando se utiliza el modelo murino en el estudio del PV (Ding et al, 1999).

A la hora de seleccionar los distintos inhibidores que teníamos que utilizar, nos basamos en sus características inhibitorias frente a las moléculas que participan en las vías de señalización intracelular que queríamos estudiar, así como en su selectividad en otros modelos experimentales publicados en la literatura. Los inhibidores que hemos utilizado en nuestro estudio PF-573,228 (inhibidor de FAK) (Slack-Davis et al, 2007), PP1 (inhibidor de Src) (Jadhav et al, 2007), rapamicina (inhibidor de mTOR) (Teachey et al, 2006), CL-387,785 (inhibidor de las isoformas HER) (Sweeney et al, 2000) y cpm-VAD-CHO (PCI) (inhibidor de caspasas) (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. La especificidad de cada uno se ha fundamentado en la información de la propia casa comercial. Algunos de ellos han sido utilizados por nuestro grupo en estudios previos en PV (Pretel et al, 2009).

La administración de cada uno de estos inhibidores se realizó 2 horas antes de la inyección de las fracciones de IgG, basándonos en nuestra experiencia previa con este mismo modelo de PV (Sánchez-Carpintero et al, 2004; Marquina et al, 2008; Pretel et al, 2009), así como en los tiempos empleados en estudios *in vivo* en animales (Pollack 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 y en algunos casos, en nuestros estudios de eficacia. En ningún caso hemos tenido problemas de toxicidad con las dosis de inhibidores finalmente empleadas, ni de fallecimiento de los animales por sobrecarga de volumen en los casos que inyectamos fracciones de 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 (Saggar et al, 2008; Grando et al, 2011 (a)).

La valoración clínica en los ratones se realizó a las 12 horas de la administración de la IgG purificada, procedente tanto de pacientes con PV como de donante sano. En estudios previos, usando nuestro modelo animal, hemos podido demostrar que la acantólisis se produce a las 11 horas tras la inyección de la IgG-PV (Pretel et al, 2009). En este trabajo decidimos esperar una hora más y realizar los 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 y a las 12 horas de la administración de la IgG-PV.

En nuestro estudio no hemos utilizado la inmunofluorescencia directa en las muestras de tejido perilesional obtenidas de los ratones inyectados con IgG-PV, con o sin inhibidores. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo ya habían demostrado que cuando se inyectaba solamente la IgG-PV y cuando se realizaba pretratamiento con inhibidores, se mantenía la unión de la IgG-PV al queratinocito (Sánchez-Carpintero et al, 2004; Pretel et al, 2009).

2. Hallazgos de los experimentos llevados a cabo en los ratones

Todos los estudios realizados en el presente trabajo van encaminados a conocer aquellos mecanismos moleculares que subyacen en las lesiones cutáneas que aparecen en los pacientes con PV para poder así utilizar fármacos más específicos para aliviar y curar mejor a nuestros pacientes. En general, con los conocimientos de que disponemos en la actualidad podemos afrontar este tratamiento desde dos perspectivas distintas.

Por un lado, sabemos que en el proceso de producción de autoanticuerpos en el PV hay interacciones entre células presentadoras de antígenos y linfocitos T autorreactivos, con selección de clones específicos de estos linfocitos (Takahashi et al, 2009) debido a una disregulación en el subtipo T supresor (Veldman et al, 2007), que conduce a una producción de anticuerpos facilitado por la presencia de células T CD4+ autorreactivas para Dsg 3 (Eming et al, 2008). Todos estos hallazgos, junto con la demostración del papel clave de la IgG-PV en la enfermedad (ya comentado previamente en la Introducción) plantea la posibilidad de un tratamiento del PV dirigido selectivamente a proteínas de membrana que se expresen en las células del sistema inmunológico durante este proceso de síntesis de IgG-PV. De este modo, se han descrito el beneficio de los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígenos CD20 en las células B (Joly et al, 2007), abriéndose nuevas perspectivas frente a otros antígenos de membrana de las células B como el CD22 (Jacobi et al, 2008).

Cabría actuar también terapéuticamente removiendo de sangre periférica todos aquellos autoanticuerpos que el paciente está produciendo de forma incontrolada, mediante plasmaféresis o mediante inmunoadsorción con columnas de afinidad (Turner et al, 2000;

Niedermeier et al, 2007). Sin embargo, estas formas de tratamiento deberán ir acompañadas de otros tratamientos inmunosupresores concomitantes para evitar *feed-back* positivos, con rebrotes de la enfermedad cuando se extraen estos anticuerpos circulantes.

Por otro lado, podemos actuar terapéuticamente en el PV mediante la administración de fármacos que interfieren con señales intracelulares que se activan en el queratinocito durante el proceso de acantólisis. Esta forma de tratamiento requiere un conocimiento molecular preciso que nos indique exactamente que moléculas intervienen en la separación de las células con rotura final de los desmosomas ya que, tal y como algunos autores han planteado, en esta enfermedad se ponen en marcha varias vías de señalización articuladas todas ellas entre sí, de manera que si anulamos una de ellas el proceso de acantólisis se bloqueará (teoría *multiple-hit*) (Grando et al, 2000).

Por todo lo expuesto, pensamos que el presente trabajo tiene gran trascendencia al ir dirigido a este aspecto molecular del PV, demostrando en esta enfermedad un papel clave de la FAK, de la activación de caspasas así como de su relación con las quinasas anteriormente implicadas en el PV, Src, mTOR y HER (Sánchez-Carpintero et al, 2004, Marquina et al, 2008; Pretel et al, 2009).

A la hora de explorar los mecanismos implicados en el PV, y “diseccionar” cada uno de ellos es importante relacionarlos con el resto de vías de señalización y mecanismos que se ponen en marcha en los queratinocitos al unirse la IgG-PV a proteínas de membrana o receptores. Así, cualquier estudio en el PV que pretenda analizar un aspecto molecular concreto de su patogenia habrá que referirlo a todos aquellos hallazgos que tienen relevancia en esta enfermedad y a los que antes me refería (ver Introducción): antígenos desmogleínicos y no desmogleínicos, IgG-PV, vías de señalización activadas dentro de los queratinocitos, “contracción” del citoesqueleto celular y mecanismo de apoptosis. Por este motivo, a continuación analizaré los hallazgos del presente trabajo interrelacionándolos con otros puntos relevantes conocidos en el PV.

Este estudio está centrado en el papel que la FAK puede tener en el PV. Su desarrollo ha estado fundamentado en las siguientes investigaciones y resultados anteriormente publicados.

Penneys publicó en 1996 (Penneys et al, 1996) que las células acantolíticas de las lesiones de PV y de PF presentaban un aumento en la expresión de la proteína FAK; mediante inmunohistoquímica observó que esta molécula se detectaba selectivamente en

los queratinocitos que se separaban de la epidermis en las lesiones de pénfigo (células acantolíticas). Sin embargo, en otras lesiones acantolíticas no autoinmunes diferentes del PV y PF (enfermedad de Hailey-Hailey, enfermedad de Darier) esta expresión era mucho más pobre. El autor concluye que el aumento de FAK en las células acantolíticas de las lesiones de PV y PF era una característica de estas dos enfermedades sin poder explicar ni postular la causa de este aumento.

Al encontrar en la literatura artículos que mostraban que los pacientes con PV tenían un aumento de anticuerpos circulantes frente al receptor de acetil-colina ((Nguyen et al, 2000), los cuales en cultivos de queratinocitos producen fosforilación de proteínas constitutivas de las adhesiones focales (incluyendo FAK), así como de citoqueratinas (Chernyavsky et al, 2007) y de proteínas constitutivas de las uniones intercelulares (β -catenina, Dsg 3), nos planteamos estudiar el papel de la FAK en el PV.

Se ha observado que la FAK ejerce muchas de sus funciones a través de una conexión directa con otras estructuras de adhesión celular como son las integrinas y las caderinas (Quadi et al, 2011), o mediada por las isoformas HER (Sieg et al, 2000), implicadas éstas directamente en el proceso de acantólisis del PV (Pretel et al, 2009; Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007). Además, el hecho de que una de las acciones de la FAK es contribuir a la reorganización del citoesqueleto celular (comentado ya en la Introducción de este trabajo) que puede estar mediada por la acción de la mTOR (Liu et al, 2008, Zhou and Huang, 2010), una quinasa fundamental para que se produzca la acantólisis del PV (Pretel et al, 2009), nos confirma nuestra intención de estudiar el papel de la FAK.

En condiciones normales, la FAK es una tirosina quinasa soluble, que tiene una función principal en la integración de señales intracelulares que se establecen en la región basal de la epidermis. Como ya he referido esta quinasa relacionada con las integrinas y las isoformas HER, tiene un papel fundamental en la adhesión celular, supervivencia, proliferación y migración de las células (vanNimwegen et al, 2007; Li et al, 2009). La Src (ver sección de Introducción) actúa directamente en la activación de esta quinasa. La localización de la FAK en las células, cuando está implicada en estas funciones, se ha demostrado en relación con la membrana basal y al menos en ratones recién nacidos esta quinasa se localiza en la periferia de las células de la capa basal (Essayem et al, 2006).

Este mismo hallazgo lo pudimos observar en los ratones a los que inyectamos únicamente IgG-SN: la expresión de P-FAK tanto en su forma Y397 como Y925 en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis presentaba un patrón periférico, próximo a la membrana basal y dejando libre el resto del citoplasma. Sin embargo, fue llamativo y sorprendente que después de administrar a los ratones IgG-PV se produjo un cambio en el patrón de expresión de la P-FAK (Y397/925) en los queratinocitos basales donde se localizaba la acantólisis y no en las zonas de la epidermis donde ésta no se desarrolló. En los queratinocitos basales acantolíticos la P-FAK (Y397/925) abarcaba todo el citoplasma, aumentando global y significativamente su expresión. Pero, nos llamó la atención que este aumento difuso de la P-FAK (Y397/925) también se produjo en células de los estratos más altos de la epidermis (en queratinocitos del techo de la ampolla). Probablemente se deba a que uno de los requisitos para que se forme la ampolla suprabasal selectivamente en el PV requiera de la presencia de moléculas o proteínas de membrana que sólo se expresan en los queratinocitos basales, como es el caso de las isoformas HER tal y como describió nuestro grupo (Pretel et al, 2009).

El aumento difuso de expresión de la P-FAK (Y397/925) en todo el citoplasma tras administrar a los ratones IgG-PV probablemente esté en relación con la acción de la FAK sobre la reorganización del citoesqueleto de la célula (Schober et al, 2007; Broussard et al, 2008; Quadri et al, 2011). La reorganización del citoesqueleto es un hallazgo demostrado que ocurre en el fenómeno de acantólisis (Gliem et al, 2010), incluso antes de que la separación entre los queratinocitos se produzca (Shimizu et al, 2004). Finalmente, la trascendencia de nuestro hallazgo de un cambio en la expresión de la P-FAK (Y397/925), y la necesidad de que este proceso se dé para ocurra la acantólisis, se pone de manifiesto al observar inhibición de la rotura de las uniones intercelulares en las muestras obtenidas de ratones que antes de administrarles IgG-PV han sido pretratados con un inhibidor de esta quinasa.

Con todo ello, se puede concluir que la FAK es una quinasa que se activa en la acantólisis del PV, fosforilándose al menos en los residuos Y397/925. Este hecho es clave para que las lesiones de PV se produzcan, probablemente por su acción sobre el citoesqueleto celular, interviniendo en la fase de contracción celular que se observa en la células basales de la epidermis (*shrinkage hypothesis*) (Bystryk et al 2006), antes de que se rompan los desmosomas (Shimizu et al, 2004) y aparezca la acantólisis (Wilgram et al, 1961; Diercks et al, 2009).

Un tema debatido en la patogenia del PV es si la apoptosis es un hecho fundamental para que se produzca acantólisis en las lesiones. Es decir, aunque existen evidencias de que la activación de marcadores de apoptosis tiene un papel en las lesiones de PV, queda por saber si su función es necesaria para que la acantólisis tenga lugar o si simplemente es un epifenómeno más en todo el proceso de separación de los queratinocitos durante la enfermedad. Además, habría que determinar si para que las lesiones de PV se produzcan es necesario que se active sólo una parte de todo el proceso (por ejemplo, activación de caspasas), o por el contrario se necesita la fragmentación nuclear que se ha observado en algunos experimentos. Para poder responder a estas cuestiones será necesario primero saber cómo están relacionadas las moléculas implicadas en la patogenia del PV con los marcadores de apoptosis.

Un hecho relevante que se desprende de nuestro estudio es la acción de la FAK sobre algunos parámetros de apoptosis. Durante el proceso de acantólisis en las lesiones de PV se produce incremento de actividad de caspasas, asociado con aumento de Bax y disminución de Bcl-2 (Gniadecki et al, 1998; Puviani et al, 2003; Wang et al, 2004; Pelacho et al, 2004; Frusic-Zlotkin et al, 2005; Arredondo et al, 2005; Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007). Estos hallazgos, demostrados por nuestro grupo en cultivos celulares (Pelacho et al, 2004), lo hemos observado también en nuestro modelo murino de PV. De forma interesante, el pretratamiento de los ratones con un inhibidor de la FAK produjo además de una ausencia de lesiones de PV clínicas e histológicas, una disminución de la activación de caspasas-3 y -9, así como de la modificación de los niveles de Bax y Bcl-2. Estos resultados, además, se acompañaron de una ausencia de células TUNEL positivas en la capa basal de la epidermis, a diferencia de lo observado en la piel de los ratones cuando solamente se administró IgG-PV, y similar a lo encontrado en los ratones a los que administramos IgG-SN.

Estos datos indican que la FAK puede tener un papel sobre marcadores de apoptosis como aparición de células TUNEL positivas en la capa basal de la epidermis, activación de caspasas y modificación de niveles de Bax/Bcl-2, amplificando la respuesta intracelular en las células que finalmente serán acantolíticas. Estas acciones serían necesarias para que estas lesiones se den, ya que si se anula la actividad de esta quinasa no aparecen las lesiones de PV en el ratón.

Para dar una unidad a todo el proceso de la acantólisis observada en el PV, e integrar los hallazgos morfológicos y moleculares encontrados (vías de señalización

activadas y marcadores de apoptosis), es necesario analizar la relación existente entre la activación de la FAK y otras moléculas y vías de señalización que se han demostrado que participan en el PV. Así, en este trabajo me he centrado también en interrelacionar la FAK con la Src, la mTOR, las isoformas HER y las caspasas, moléculas cuyo papel en el PV ya ha sido investigado por nuestro grupo de trabajo (Pretel et al, 2009).

De nuestro estudio, y de hallazgos previos de nuestro grupo, se desprende un papel relevante de la mTOR en la patogenia del PV, y de la activación de marcadores de apoptosis encontrada en las lesiones de PV en un modelo murino (Pretel et al, 2009). Esta quinasa puede tener una función de supervivencia o muerte celular, dependiendo de las circunstancias particulares de cada célula (Asnaghi et al, 2004). La Akt, una quinasa implicada en funciones de supervivencia celular (Calauti et al, 2005), en condiciones normales, tiene un papel clave en la maduración celular. En los estudios de nuestro grupo de trabajo se observó que la expresión de P-Akt en las células basales de la epidermis de ratones fue casi indetectable tras la administración de IgG-PV. Sin embargo, los niveles detectados en las muestras de los ratones pretratados con rapamicina (inhibidor de mTOR) e inyección posterior de fracciones de IgG-PV eran muy similares a las de los ratones tratados con IgG-SN. Por el contrario, se observó un aumento significativo de P-mTOR en células basales epidérmicas de los ratones tras la inyección de IgG-PV (Pretel et al, 2009). Por tanto, en las lesiones de PV probablemente lo que ocurra es un desequilibrio entre Akt/mTOR localizado selectivamente en los queratinocitos basales de la epidermis y no en otros niveles. Esta hipótesis se reforzó aún más al observar una remisión de las lesiones clínica e histológicamente en los ratones cuando se les pretrató con rapamicina. En el presente trabajo, a nuestros estudios previos se añade que la administración de un inhibidor de mTOR previo a la inyección de IgG-PV, además de impedir el desarrollo de las lesiones de PV en los ratones provoca una eliminación de la modificación tanto de los niveles de Bax y Bcl-2 como de la actividad de las caspasas-3 y -9, siendo similares a los observados cuando a los ratones se les inyectó solamente IgG-SN.

Nuestros hallazgos tienen una total concordancia con otros descritos en la literatura en otras líneas celulares, sin saber si son extrapolables en el PV. Se ha afirmado que la acción de la mTOR (Liu et al, 2008) podría mediar la reorganización del citoesqueleto llevado a cabo por la FAK (Schober et al, 2007; Broussard et al, 2008). En concreto, el complejo mTORC2 tiene una acción centrada en la reorganización del citoesqueleto celular, a través de la acción de otras quinasas como GTPasas, SGKs, PKC α y FAK (Zhou

and Huang, 2010). Nosotros hemos demostrado que si administramos rapamicina a los ratones previo a la inyección de fracciones de IgG-PV, disminuye de manera significativa la expresión de P-FAK (Y397/925) detectándose un cambio en su localización. Queda un campo abierto que deberá explorarse y demostrar si realmente el papel que hemos demostrado de la mTOR en el PV, con una acción sobre el citoesqueleto de las células acantolíticas es mediado realmente a través de mTORC2.

Por otro lado, en aquellos procesos en los que se produce un daño en los microtúbulos y se induce un incremento en la actividad mTOR, se observa también un incremento de los niveles de Bax así como de citocromo C, caspasas-3 y -9 (Chen et al, 2008). En el PV podría existir un mecanismo de reorganización del citoesqueleto (con contracción del mismo, tal y como he comentado anteriormente), facilitado probablemente por la FAK que cambiaría de localización desde la membrana al resto del citoplasma. Esto permitiría inducir marcadores de apoptosis probablemente a través de la mTOR, la cual aumentaría selectivamente en la capa basal, posiblemente favorecido por la acción de la Src (Pretel et al, 2009), permitiendo la fosforilación/ degradación de Bcl-2, incrementando los niveles de Bax e induciendo la activación de caspasas (**Figura 34**). A su vez, el hecho de que hayamos observado una disminución en la expresión de la mTOR cuando pretratamos a los ratones con un inhibidor de la FAK antes de administrar IgG-PV, nos habla de un posible “bucle” (*loop*) que dentro de la célula puede mantener la acción de la FAK y mTOR. Además el efecto beneficioso de la rapamicina cuando ésta se ha administrado a pacientes con PV (Saggar et al, 2008; Grando et al, 2011) confirma aún más nuestros resultados.

Otro hallazgo importante que se desprende de nuestro presente trabajo es la relación entre la FAK y la Src. Tal y como comenté anteriormente en la Introducción, la FAK se fosforila por la Src en los residuos Y407, Y576, Y577, Y861 y Y925, y se autofosforila en el residuo Y397. Si impedimos este proceso mediante la administración de PP1 (inhibidor de Src), se anula en un porcentaje importante la activación de la FAK. Además, pudimos comprobar en este trabajo que la administración de un inhibidor de la FAK produjo una disminución significativa de la expresión de P-Src en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis. Este hecho puede ser debido a la capacidad que presenta la FAK autofosforilada para reclutar a la propia Src (Li et al, 2008). Junto a estos hechos, además observamos que la administración de PP1, previa a la inyección de IgG-PV, tenía un efecto directo sobre los niveles de Bax/Bcl-2 y actividad de caspasas-3 y -9, igualando los valores

obtenidos a aquellos observados cuando sólo inyectamos en los ratones IgG-SN. Estos hallazgos están en relación directa con la demostración previa de nuestro grupo de una ausencia de células TUNEL positivas en la capa basal por el pretratamiento de los ratones con un inhibidor de la Src. En resumen, nuestros hallazgos muestran que durante el proceso de acantólisis en el PV se produce activación de Src (Sánchez-Carpintero et al, 2004; Pretel et al, 2009; Chernyavsky et al, 2007). Esta activación puede ser debida a una activación de las isoformas HER como ya demostró nuestro grupo de investigación (Pretel et al, 2009) o mediada en parte por la activación de la FAK. La activación de la FAK puede ser a su vez secundaria a la fosforilación de la Src, estableciéndose un nuevo *loop*. Tanto las isoformas HER como la Src podrían intervenir en la activación de las caspasas y en marcadores de apoptosis probablemente a través de la activación de la FAK (**Figura 34**).

Idénticos resultados a los observados con el inhibidor de Src empleado, los encontramos con el inhibidor de las isoformas HER, cuando pretratamos a los ratones con éste antes de administrarles fracciones de IgG-PV. Estos hallazgos pueden explicarse tomando como base trabajos publicados en la literatura. La actividad de la FAK puede incrementarse en la célula debido a su reclutamiento e interacción, a través de su dominio N-terminal, con el EGFR fosforilado (Sieg et al, 2000), el cual es conocido que se activa en los queratinocitos basales al exponerse a IgG-PV (Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007; Pretel et al, 2009). Por otro lado, en trabajos previos de nuestro grupo encontramos que la inhibición de las isoformas HER en el PV anula la aparición de células TUNEL positivas en la capa basal de la epidermis además de anular la acantólisis (Pretel et al, 2009). En este trabajo, además de confirmar esos hallazgos, observamos que en los ratones pretatados con un inhibidor de las isoformas HER (CL-387,785) se producía una disminución en la expresión de FAK fosforilada (Y397/925), así como un cambio en su localización, expresándose solamente en la periferia de la célula, con un patrón de membrana similar al encontrado cuando se administró a los ratones sólo IgG-SN. A su vez, estos hallazgos se acompañaron de una normalización de los niveles de Bax y Bcl-2, así como de la actividad de caspasas-3 y -9, que fueron similares a los encontrados cuando se administró a los ratones solamente IgG-SN. Por tanto, en este trabajo se confirman la normalización de los valores de los marcadores de apoptosis cuando se pretratan los ratones con inhibidor de las isoformas HER antes de la inyección de IgG-PV, todo ello

quizá debido a la inactivación en la fosforilación de la FAK (**Figura 34**). De esta manera se contribuiría también a frenar la acantólisis final.

Un último punto importante relacionado con la patogenia del PV está relacionado con la apoptosis y la activación de caspasas. Tal y como comenté anteriormente, éste es un tema debatido en la actualidad, existiendo argumentos a favor y en contra en la literatura. Está aceptado que en las biopsias de las lesiones de PV no se observan alteraciones morfológicas celulares de los queratinocitos características de apoptosis, tal y como se encuentran en otros procesos como por ejemplo el liquen plano o la enfermedad injerto contra huésped. Sin embargo, existen en las células acantolíticas algunas evidencias de hallazgos bioquímicos de apoptosis. La mayoría de los estudios que han analizado este punto se han llevado a cabo en cultivo de queratinocitos o también en algún caso en biopsias de pacientes (Gniadecki et al, 1998; Puviani et al, 2003; Wang et al, 2004; Baroni et al, 2004; Pelacho et al, 2004; Wolf et al, 2005; Frusic-Zlotkin et al, 2005; Arredondo et al, 2005; Frusic-Zlotkin et al, 2006; Chernyavsky et al, 2007; Cirilo et al, 2010). En cultivos de queratinocitos tratados con IgG-PV se han encontrado un incremento de FasL, FasR, p53, así como de caspasas-1, -3 y -8. En estudios de biopsias de pacientes con PV se han observado células TUNEL positivas, con presencia de núcleos picnóticos y condensados tanto en piel lesional como perilesional (Gniadecki et al, 1998; Puviani et al, 2003; Wang et al, 2004), con incremento en la expresión de FasR y FasL, p53, Bax, activación de caspasa 8 y disminución de Bcl-2 (Wang et al, 2004). A su vez, niveles elevados de FasL fueron detectados en el suero de pacientes con PV comparados con sujetos sanos (Puviani et al, 2003). Sin embargo, otros autores solamente han observado en alguna de las biopsias de PV células TUNEL positivas aisladas, en la proximidad de las lesiones activas (Schmidt et al, 2009 (a)). Hay otros trabajos realizados con biopsias de pacientes donde no han encontrado hallazgos de apoptosis en los queratinocitos (Schmidt et al, 2009 (b)). En resumen, existen evidencias de que en cultivos celulares se observan datos que apuntan al papel de la apoptosis o de algunas moléculas relacionadas con ella durante el proceso de acantólisis, siendo contradictorios los hallazgos encontrados en estudios realizados en biopsias de pacientes con PV.

Durante el proceso de apoptosis se producen varios fenómenos como son la activación de caspasas, dependiente o no del apoptosoma, la condensación del citoesqueleto, y la fragmentación del núcleo, tornándose más picnótico en los tejidos (Taylor et al, 2008). Sin embargo, este último punto, tal y como comentaba anteriormente,

no se suele observar morfológicamente en las preparaciones histológicas de las lesiones de acantólisis de PV. De todos los estudios sobre la apoptosis en el PV me gustaría centrarme en cuatro observaciones que nos pueden ayudar a poner un poco más de luz a esta cuestión.

En primer lugar Wang y cols. (Wang et al, 2004) observaron que la actividad de caspasas aparecía de forma temprana en cultivos celulares a los que se le añadía IgG-PV, incrementándose progresivamente, apareciendo tiempo después los fenómenos de apoptosis y un poco después las alteraciones características de apoptosis. Es decir, la actividad de caspasas podría intervenir en la acantólisis, incluso antes que la fragmentación nuclear (núcleos picnóticos) se forme.

Por otra parte, varios trabajos han revelado que la p38 MAPK contribuye a la reorganización del citoesqueleto celular en la acantólisis del PV (Berkowitz et al, 2005; Berkowitz et al, 2006). Esta quinasa aumenta bifásicamente en los cultivos celulares estimulados con IgG-PV, muy precozmente en las primeras horas, y posteriormente unas horas después de forma progresiva, pero antes de que se produzcan los fenómenos de apoptosis (fragmentación nuclear) (Lee et al, 2009). Estos autores concluyen que este primer aumento de p38 MAPK estaría relacionado directamente con los fenómenos de acantólisis, mientras que el segundo aumento estaría relacionado con el fenómeno de apoptosis. En otras palabras, los autores diferencian entre ambos procesos (acantólisis y apoptosis) separándolos en el tiempo.

Chernyavsky y cols. (Chernyavsky et al, 2007) observan en cultivos de queratinocitos estimulados con IgG-PV que la activación de las diferentes vías moleculares y procesos intracelulares en los queratinocitos acantolíticos es distinta a lo largo del tiempo. Encuentran que la Src se incrementa a los pocos minutos, los fenómenos de condensación del citoesqueleto aparecen a los 120-240 minutos, y el aumento de p38 MAPK se produce a los 240 minutos, unos minutos antes de la aparición de fenómenos TUNEL en los queratinocitos (360 minutos). Los autores concluyen que la activación precoz de la Src tendría un papel directo en la condensación del citoesqueleto celular, mientras que la p38 MAPK ejercería su acción directamente sobre los fenómenos de apoptosis (fragmentación nuclear con aparición de células TUNEL positivas).

Por último, Cirillo y cols. (Cirillo et al, 2010) observan en cultivos de queratinocitos que tras la estimulación con IgG-PV el aumento de caspasas aparece muy precozmente, contribuyendo directamente en la acantólisis y siendo independiente de la

apoptosis; la fragmentación nuclear de las células es un fenómeno más tardío. Es decir, observan que sólo la activación de caspasas, sin necesidad de que se complete el resto de la cascada de la apoptosis (fragmentación nuclear), sería realmente necesario para que la acantólisis se produzca. El trabajo de Cirillo y cols. estaría en total consonancia con los hallazgos de nuestro trabajo y en estudios previos de nuestro grupo (Pretel et al, 2009), así como de otros grupos (Wang et al, 2004; Chernyavsky et al, 2007), al observar que la administración de inhibidores de pan-caspasas provoca una inhibición de la acantólisis, con reversión de los niveles de Bax/Bcl-2 y de la activación de caspasas-3 y -9.

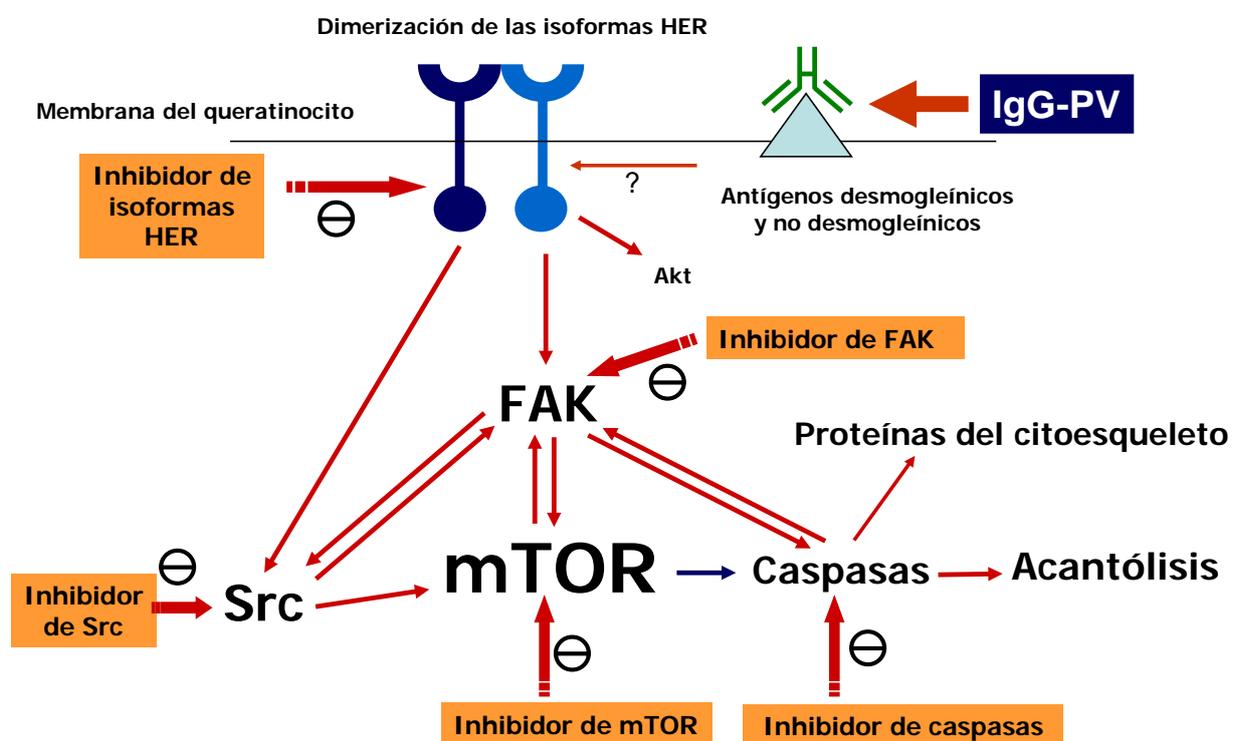


Figura 34. Gráfico que muestra nuestra hipótesis de trabajo, para explicar cómo moléculas intracelulares como las quinasas Src, mTOR, isoformas HER y FAK, tomando parte en el desarrollo de la acantólisis en el PV, ejercen una acción sobre el citoesqueleto, permitiendo además la activación de la vía de la apoptosis.

Estos hallazgos tienen un significado mayor al demostrarse múltiples acciones de las caspasas (más de 400 substratos) (Lüthi et al, 2007), distintas de aquellas más conocidas sobre el núcleo celular y destacando su acción sobre proteínas constitutivas de las uniones intercelulares, como son α/β cateninas, desmoplaquina, Dsg 1 y Dsg 3,

desmocolina y E-cadherina entre otras, además de dañar el propio citoesqueleto de la célula (Kitazumi et al, 2011), contribuyendo todo ello para que los desmosomas puedan separarse. Así, si anulamos la actividad de estas proteasas provocaríamos una ausencia de acantólisis, y este hecho provocaría además que no se produjeran fenómenos de apoptosis.

Las caspasas activadas pueden mostrar una relación directa con otras quinasas. Nuestro trabajo muestra que la Src, probablemente a través de su acción sobre la mTOR puede tener un efecto directo sobre las caspasas. Además, la FAK puede mostrar un efecto sobre las caspasas y éstas sobre aquella. Finalmente, la mTOR puede ejercer una acción sobre las caspasas y éstas sobre aquella, potenciando aún más el mecanismo de acantólisis observado (**Figura 34**).

En resumen, el proceso de acantólisis es consecuencia de un conglomerado de vías intracelulares de señalización y moléculas que se activan de forma coordinada, las cuales se necesitan mutuamente para que el proceso final de separación de los desmosomas se produzca. Nuestros resultados, confrontados con los de la literatura, muestran que tras la unión de los autoanticuerpos circulantes en pacientes con PV a sus respectivos antígenos (probablemente desmogleínicos y no desmogleínicos), se activen varios mecanismos moleculares intracelulares y moléculas como las quinasas Src, mTOR, isoformas HER y FAK, tomando parte en el desarrollo de la acantólisis. Estas moléculas ejercerían una acción sobre el citoesqueleto, permitiendo además la activación de la vía de la apoptosis. No obstante, de todo el proceso de apoptosis solamente contribuirían directamente en la acantólisis la activación de caspasas, ayudando a través de su acción proteasa a dañar el citoesqueleto y proteínas estructurales necesarias para la adhesión intercelular. De forma más tardía estas mismas moléculas, al igual que las caspasas, podrían de manera coordinada poner en marcha mecanismos de apoptosis (con disminución de Bcl-2 y aumento de Bax, entre otros), apareciendo más tardíamente, y por lo general después de la acantólisis, el fenómeno de fragmentación nuclear (**Figura 34**).

Nuestros hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen en el PV y permitirán tratar de forma más específica esta enfermedad. Tal y como comentaba anteriormente, el hecho de que se hayan publicado ya artículos que muestran el beneficio de fármacos inhibidores de algunas de estas quinasas, como es el caso de la rapamicina (Saggar et al, 2008; Grandó et al, 2011) abre un panorama más esperanzador en el tratamiento del PV. Y por eso, aunque tengamos que utilizar inicialmente corticosteroides por sus acciones múltiples en el PV (Nguyen et al, 2004), la

administración posterior de fármacos más específicos nos ayudarán a disminuir los efectos secundarios de éstos por su uso prolongado y crónico.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abasq C, Mouquet H, Gilbert D et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch Dermatol* 2009;145:529-35.
- Aguado L, Marquina M, Pretel M, et al. Lesions of pemphigus vulgaris on irradiated skin. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:148-50.
- 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.
- Akman A, Uzun S, Alpsoy E. Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: a prospective study. *Skinmed* 2010;8:12-6.
- Alemà S, Salvatore AM. p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:47-58.
- Alexandroff AB, Harman KE. Blistering skin disorders: an evidence-based update. Conference report. *Br J Dermatol* 2009;160:502-4.
- Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410:83-6.
- 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, 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, 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, Zillikens D. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:167-70.
- Amagai M, Hashimoto T, 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., 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.
- 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.
- Aoyama Y, Nagai M, Kitajima Y. Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune complexes rather than directly splitting desmosomes. *Br J Dermatol* 2010;162:1049-55.
- 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.
- Arakawa M, Dainichi T, Yasumoto S, et al. Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Dermatol Sci* 2009;53:228-31.
- Arnemann J, Sullivan KH, Magee AI, et al. Stratification-related expression 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.
- Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, et al. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res* 2004;50:545-9.
- Baroni A, Buommino E, Paoletti I, et al. Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. *Br J Dermatol* 2004;150:1070-80.
- Barros FF, Powe DG, Ellis IO, et al. Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology* 2010;56:560-72.

- Baruzzi A, Cavegion E, Berton G. Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2175-90.
- Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, et al. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. *J Invest Dermatol* 1995;104:302-5.
- 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.
- Bektas M, Rubenstein DS. Perp and pemphigus: a disease of desmosome destabilization. *J Invest Dermatol* 2009;129:1606-8.
- Benati D, Baldari CT. SRC family kinases as potential therapeutic targets for malignancies and immunological disorders. *Curr Med Chem* 2008;15:1154-65.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bhol K, Mohimen A, Ahmed AR. Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. *Dermatology* 1994;189:85-9.
- 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.
- Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:85-90.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond M, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857-68.
- Bystryń JC, Grando SA. A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hipótesis. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:513-6.
- Bystryń JC, Steinman NM. The adjuvant therapy of pemphigus. An update. *Arch Dermatol* 1996;132:203-12.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 2010;16:34-4.
- Chen L, Liu L, Luo Y, et al. MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem* 2008;105:251-61.

- 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(a).
- Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, et al. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res* 2007;313:3542-55(b).
- 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.
- Cirillo N, Lanza A, Prime S. Apoptosis-independent caspase activation as a early pathogenic event in the autoimmune skin disease pemphigus vulgaris. Poster presentado en JC Bystryn pemphigus & pemphigoid meeting: from the bench to the bedside. Bethesda, ML, USA, noviembre 5-6, 2010.
- Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 2006;25:6347-60.
- Coultas L, Pellegrini M, Visvader JE, et al. Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ* 2003;102:185-92.
- Craig SW, Johnson RP. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:74-85.
- 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.
- Czernik A, Toosi S, Bystryn JC, et al. Intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune bullous dermatoses: An update. *Autoimmunity* 2012;45:111-8.
- Dainichi T, Koga H, Tsuji T, et al. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol* 2010;37:231-8.
- Daoud YJ, Cervantes R, Foster CS, et al. Ocular pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:585-90.

- Dar SA, DAS S, Bhattacharya SN, et al. Possible role of superantigens in inducing autoimmunity in pemphigus patients. *J Dermatol* 2011;38:980-7.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
- Davies L, Gray D, Spiller D, White MR, et al. P53 apoptosis mediator PERP: localization, function and caspase activation in uveal melanoma. *J Cell Mol Med* 2009;13:1995-2007.
- 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 Messias-Reason IJ, Nisihara RM, et al. Mannan-binding lectin and ficolin deposition in skin lesions of pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2011;303:521-5.
- 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.
- 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.
- Dumas V, Roujeau JC, Wolkenstein P, et al. The treatment of mild pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus with a topical corticosteroid. *Br J Dermatol* 1999;140:1127-9.
- 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.
- Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, et al. Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2008;128:2850-8.
- 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, Fernandez S, del Olmo J, et al. Ear, nose and throat manifestations in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2007;156:733-7.
- 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, 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.
- Essayem S, Kovacic-Milivojevic B, Baumbusch C, et al. Hair cycle and wound healing in mice with a keratinocyte-restricted deletion of FAK. *Oncogene* 2006;25:1081-9.
- Evangelista F, Dasher DA and Diaz LA. The prevalence of autoantibodies against E-cadherin in pemphigus. *J Invest Dermatol* 2008;128:1710-8.
- 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.

- 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, et al. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity* 2006;39:563-75(a).
- 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(b)
- Fujii M, Honma M, Iinuma S, et al. Recalcitrant facial pemphigus vulgaris: correlation of skin lesions with the ratio of antidesmoglein antibodies 1 and 3. *Clin Exp Dermatol* 2011;36:284-7.
- 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.
- 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.
- Gliem M, Heupel WM, Spindler V, et al. J. Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C606-13.
- 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.
- 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, Bystryjn JC, Chernyavsky AI, et al. Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. *Exp Dermatol* 2009;18:764-70.

- Grando SA, Laquer VT, Le HM. Sirolimus for acute pemphigus vulgaris: a case report and discussion of dualistic action providing for both immunosuppression and keratinocyte protection. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:684-6.
- Grando SA, Pittelkow MR, Shultz LD, et al. Pemphigus: an unfolding store. *J Invest Dermatol* 2001;117:990.
- Grando SA. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* 2000;201:290-5.
- Grando SA. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. *Autoimmunity* 2012, 45:7-35.
- Grando, SA. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* 2006;15:265-82.
- 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.
- 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.
- Guan JL, Shalloway D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 1992;358:690-2.
- 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.
- 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.
- Heaphy MR, Albrecht J, Werth VP. Dapsone as a glucocorticoid-sparing agent in maintenance-phase pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 2005;14:699-702.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
- Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006;116:1159-66.

- 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.
- Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, et al. The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmogleins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. *Br J Dermatol* 2004;151:73-83.
- Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: Directing Key Signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:195-217.
- Howell SM, Bessinger GT, Altman CE, Belnap CM. Rapid response of IgA pemphigus of the subcorneal pustular dermatosis subtype to treatment with adalimumab and mycophenolate mofetil. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:541-3.
- Hu CH, Michel B, Schiltz JR. Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1978;90:345-61.
- 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.
- Imao M, Nagaki M, Imose M, Moriwaki H. Differential caspase-9-dependent signaling pathway between tumor necrosis factor receptor- and Fas-mediated hepatocyte apoptosis in mice. *Liver Int* 2006;26:137-46.
- Iraji F, Asilian A, Siadat AH. Pimecrolimus 1% cream in the treatment of cutaneous lesions of pemphigus vulgaris: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Drugs Dermatol* 2010;9:684-6.
- Iraji F, Banan L. The efficacy of nicotinamide gel 4% as an adjuvant therapy in the treatment of cutaneous erosions of pemphigus vulgaris. *Dermatol Ther* 2010;23:308-11.

- 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, Harada H, Yokote R, et al. Differences in the expresión of pemphigus antigens during epidermal differentiation. *Br J Dermatol* 1995;133:209-16.
- Iwatsuki K, Takigawa M, Hashimoto T, et al. Can pemphigus vulgaris become pemphigus foliaceus? *J Am Acad Dermatol* 1991;25:797-800.
- Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F, et al. Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum Dis* 2008;67:450-7.
- Jadhav V, Matchett G, Hsu FP, Zhang JH. 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.
- 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.
- Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol* 2011;29:432-6.
- Joly P. Autoimmune blistering skin diseases: recent advances. *Presse Med* 2010;39:1040-1.
- 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.
- Kalantari-Dehaghi M, Molina DM, Farhadieh M, et al. New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology. *Exp Dermatol* 2011;20:154-6.

- 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.
- Kataoka H. EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci* 2009;56:148-53.
- 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 D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 2002;31;35:106-15.
- 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 Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4:137-44.
- 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.
- Kitazumi I, Tsukahara M. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J* 2011;278:427-41.
- 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.
- Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci* 2006;119:797-806.
- 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.
- Lanza A, Cirillo N, Femiano F, Gombos F. How does acantholysis occur in pemphigus vulgaris: a critical review. *J Cutan Pathol* 2006;33:401-12.
- Lanza A, Lanza M, Santoro R, et al. Deregulation of PERK in the autoimmune disease pemphigus vulgaris occurs via IgG-independent mechanisms. *Br J Dermatol* 2011;164:336-43.
- 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.
- Lewis JE, Jensen PJ, Wheelock MJ. Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol* 1994;102:870-7.
- 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.
- Li S, Hua ZC. FAK expression regulation and therapeutic potential. *Adv Cancer Res* 2008;101:45-61.
- 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.

- Liu W, Bloom DA, Cance WG, et al. FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2008;29:1096-107.
- Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S et al. Strict correlation between uPAR and plakoglobin expresión 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.
- 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.
- 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.
- Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007;14:641-50.
- Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995;60:323-71.
- Mahoney MG, Hu Y, Brennan D, et al. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp Dermatol* 2006;15:101-9.
- 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.
- Mao X, Nagler AR, Farber SA, et al. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol* 2010;177:2724-30.

- Mao X, Sano Y, Park JM, Payne AS. p38 MAPK activation is downstream of the loss of intercellular adhesion in pemphigus vulgaris. *J Biol Chem* 2011;286:1283-91.
- Marchenko S, Chernyavsky AI, Arredondo J, et al. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology. *J Biol Chem* 2010;285:3695-704.
- 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.
- Martel P, Joly P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. *Clin Dermatol* 2001;19:662-74.
- Mascaró JM Jr, España A, Liu Z. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:90-6.
- Mejri K, Abida O, Kallel-Sellami M, et al. Spectrum of autoantibodies other than anti-desmoglein in pemphigus patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:774-81.
- 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.
- Mian MF, Kang C, Lee S, et al. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. *Chem Biol Interact* 2008;171:57-66.
- 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.

- Modol T, Natal C, Perez de Obanos MP, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells mediated by specific protein nitration. *Biochem Pharmacol* 2011;81:451-8.
- 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.
- Muller R, Heber B, Hashimoto T, et al. Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:898-903.
- 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. 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.
- Nagasaka T, Nishifuji K, Ota T, et al. Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1484-92.
- 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 B, Dusek RL, Beaudry VG, et al. Loss of the desmosomal protein perp enhances the phenotypic effects of pemphigus vulgaris autoantibodies. *J Invest Dermatol* 2009;129:1710-8.
- Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, et al. Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists. *Arch Dermatol* 2004;140:327-34(a).

- 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(b).
- Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, et al. Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Exp Cell Res* 2004;294:534-49(c).
- 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, 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.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22:299-306.
- Niedermeier A, Eming R, Pfütze M, et al. Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoadsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). *Arch Dermatol* 2007;143:192-8.
- Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, et al. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:876-85.
- O'Shaughnessy RFL, Welti JC, Cooke JC, et al. AKT-dependent HspB1 (Hsp27) activity in epidermal differentiation. *J Biol Chem* 2007;282:17297-305.
- Oktarina DA, van der Wier G, Diercks GF, et al. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. *Br J Dermatol* 2011;165:552-62.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-67.
- 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.

- Palleschi GM, Giomi B, Fabbri P. Ocular involvement in pemphigus. *Am J Ophthalmol* 2007;144:149-52.
- Pan M, Liu X, Zheng J. The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2011;36:703-7.
- 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, et al. 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.
- Pretel M, Espana A, Marquina M, et al. An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 2009 ;18:771-80.
- 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, YJ, et al. Dissecting the anti-desmoglein autoreactive b cell repertoire in pemphigus vulgaris patients. *J Immunol* 2007;178:5982-90.

- Quadri SK. Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: Role in regulating endothelial barrier function. *Microvasc Res* 2012 ;83:3-11.
- Rafei D, Muller R, Ishii N, et al. IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *Am J Pathol* 2011;178:718-23.
- 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.
- Renkl A, Mockenhaupt M, Technau K, Herouy Y, Norgauer J. A novel therapeutic option in pemphigus vulgaris: humanized monoclonal anti-CD25 antibody. *Br J Dermatol* 2004;150:1220-2.
- 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.
- Risser J, Lewis K, Weinstock MA. Mortality of bullous skin disorders from 1979 through 2002 in the United States. *Arch Dermatol* 2009;145:1005-8.
- 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.
- Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 2007;46:383-93.
- 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.
- Saha M, Harman K, Mortimer NJ, et al. Pemphigus vulgaris in White Europeans is linked with HLA Class II allele HLA DRB1*1454 but not DRB1*1401. *J Invest Dermatol* 2010;130:311-4.

- Salas JT, Banales JM, Sarvide S, et al. Ae2a,b-deficient mice develop antimitochondrial antibodies and other features resembling primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2008;134:1482-93.
- Salato VK, Hacker-Foegen MK, Lazarova Z, et al. Role of intramolecular epitope spreading in pemphigus vulgaris. *Clin Immunol* 2005;116:54-64.
- Sami N, Ahmed AR. Penile pemphigus. *Arch Dermatol* 2001;137:756-758.
- 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.
- 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.
- Schaefer BM, Jaeger C, Kramer MD. Plasminogen activator system in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1996; 135:726.
- 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.
- Schultz JR, Michel B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 1976;67:254-60.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.
- 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(a).
- Schmidt E, Waschke J. Apoptosis in pemphigus. *Autoimmun Rev* 2009;8:533-7 (b).
- Schober M, Raghavan S, Nikolova M, et al. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 2007;176:667-80.
- Schultz HY. Scientific highlights from the 71st Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. *J Invest Dermatol* 2011;131:1963-7.

- Schulze K, Galichet A, Sayar BS, et al. An Adult Passive Transfer Mouse Model to Study Desmoglein 3 Signaling in Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol* 2012;132:346-55.
- 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.
- Seishima M, Satoh S, Nojiri M, et al. Pemphigus IgG induces expresión of urokinase plasminogen activator receptor of cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997;109:650.
- Sekulić 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.
- 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.
- Sharma P, Mao X, Payne AS. Beyond steric hindrance: the role of adhesión signaling pathways in the patogénesis 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.
- Shetty A, Marcum CB, Glass LF, Carter JD. Successful treatment of pemphigus vulgaris with etanercept in four patients. *J Drugs Dermatol* 2009;8:940-3.
- 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.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000;2:249-56.

- 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.
- Sitaru C, Zillikens D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol* 2005;14:861-75.
- Slack-Davis JK, Martin KH, Tilghman RW, et al. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J Biol Chem* 2007;282:14845-52.
- 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.
- Spindler V, Heupel WM, Efthymiadis A, et al. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem* 2009;284:30556-64.
- Stanley JR, Koulu L, Thivolet C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 1984;74:313-20.
- Stanley JR, Yaar M, Hawley-Nelson P. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982;70:281-8.
- Stavropoulos 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.
- Sweeney WE, Chen Y, Nakanishi K, et al. Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int* 2000;57:33-40.

- 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.
- Takahashi H, Kouno M, Nagao K, et al. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest* 2011;121:3677-88.
- Takahashi H, Kuwana M, Amagai M. A single helper T cell clone is sufficient to commit polyclonal naive B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2009;182:1740-5.
- 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.
- 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.
- Talieri M, Diamandis EP, Katsaros N, et al. Expression of BCL2L12, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors. *Thromb Haemost* 2003;89:1081-8.
- Tamesa MS, Kuramitsu Y, Fujimoto M, et al. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* 2009;30:2168-81.
- Tanikawa A, Amagai M. Pemphigus treatment in Japan. *Dermatol Clin* 2011;29:685-6.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev* 2008;9:231-41.
- Teachey DT, Obzut DA, Axsom K, et al. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* 2006;108:1965-71(a).
- 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(b).

- 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.
- Tomar A, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:676-83.
- Toosi S, Habib N, Torres G, et al. Serum Levels of Inhibitors of Apoptotic Proteins (IAPs) Change with IVIg Therapy in Pemphigus. *J Invest Dermatol* 2011;131:2327-9.
- Torzecka JD, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, et al. Detection of pemphigus autoantibodies by IIF and ELISA tests in patients with pemphigus vulgaris and foliaceus and in healthy relatives. *Med Sci Monit* 2003;9:CR528-33.
- 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, Saito M, et al. Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol* 2011;179:795-806.
- Tsunoda K., Ota T, 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/heregulin 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.

- van Nimwegen MJ, van de Water B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007;73:597-609.
- Veldman C, Eming R, Wolff-Franke S, et al. Detection of low avidity desmoglein 3-reactive T cells in pemphigus vulgaris using HLA-DR beta 1*0402 tetramers. *Clin Immunol* 2007;122:330-7.
- 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.
- Wilgram GF, Caulfield JB, Lever WF. An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 1961;36:373-82.
- 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.
- 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.
- Wool S, Windoffer R, Leube RE. p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoeskeleton in cultured cells. *J Cell Biol* 2007;177:795-807.
- Yamamoto T, Ikeda K, Sasaoka S, et al. Human leukocyte antigen genotypes and antibody profiles associated with familial pemphigus in Japanese. *J Dermatol* 2011;38:711-6.
- Yazganoglu KD, Baykal C, Kucukoglu R. Childhood pemphigus vulgaris: five cases in 16 years. *J Dermatol* 2006;33:846-9.

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; 129:2156-66.

Yu H, Jove R. The STATs of cancer – new molecular targets come of age. *Nature Rev Cancer* 2004;4:97-105.

Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:35-49.

Zhou H and Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11:409-24.

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.

VIII.- ANEXO

VI.- CONCLUSIONES

1.- Hemos podido demostrar un aumento significativo en la expresión de la P-FAK (Y397/925) en las células acantolíticas de la epidermis en un modelo murino de PV. Este aumento se expresa en un patrón citoplasmático. Además hemos comprobado que en las muestras obtenidas de ratones pretratados con un inhibidor de FAK (PF 573, 228) se anula la acantólisis. Estos hechos sugieren la participación de esta quinasa en el proceso de acantólisis del PV, probablemente como consecuencia de su acción sobre el citoesqueleto celular en la fase de contracción celular que se observa en las células basales de la epidermis.

2.- Hemos podido comprobar una modulación ejercida por la FAK sobre algunos parámetros de apoptosis. En las lesiones de PV de nuestro modelo murino se produjo un incremento de actividad de caspasas, asociado con aumento de Bax y disminución de Bcl-2, además de la presencia de células basales de la epidermis TUNEL positivas. Estas acciones se eliminan y no aparecen las lesiones de acantólisis si se anula la actividad de la FAK al pretratar los ratones con un inhibidor específico de esta quinasa.

3.- En el presente trabajo establecemos una relación entre la mTOR y la FAK. Observamos que la administración de un inhibidor de mTOR (rapamicina) en los ratones provoca una disminución significativa en la expresión de P-FAK (Y397/925), así como un cambio en su localización. Además, hemos demostrado una disminución en la expresión de la P-mTOR cuando pretratamos a los ratones con un inhibidor de la FAK (PF-573, 228), lo cual nos habla de un posible “bucle” (*loop*) que dentro de la célula puede mantener la acción de la FAK y mTOR. Unidos a estos datos hemos comprobado una relación entre mTOR y marcadores de apoptosis, observando una normalización tanto de los niveles de Bax y Bcl-2 como de la actividad de las caspasas-3 y -9 al pretratar los ratones con un inhibidor de mTOR. Tal vez este hecho esté mediado por la FAK.

4.- Hemos comprobado la relación entre la FAK y la Src en nuestro modelo murino de PV. La administración de un inhibidor de Src (PP1) disminuyó significativamente la expresión de la P-FAK (Y397/925) cambiando su distribución en las células acantolíticas, y la administración de un inhibidor de la FAK (PF-573, 228) produjo una disminución significativa de la expresión de P-Src en aquellas. Así, la activación de Src ya demostrada en estudios previos de nuestro grupo de trabajo, puede ser debida en parte a un incremento en la activación de la FAK. Esta mayor activación de la FAK puede ser a su vez secundaria a la fosforilación de la Src, estableciéndose un nuevo *loop*. Junto a estos hechos, además observamos que la administración de un inhibidor de Src (PP1) tenía un efecto directo

sobre los niveles de Bax/Bcl-2 y actividad de caspasas-3 y -9, normalizándose sus valores a aquellos observados cuando sólo inyectamos en los ratones IgG-SN. Es posible que estos hechos estén en parte mediados por la FAK.

5.- Hemos podido demostrar una relación entre las isoformas HER y la expresión de la P-FAK (Y397/925) en nuestro modelo murino. Los ratones pretratados con un inhibidor de las isoformas HER (CL-387,785) mostraron una disminución significativa en la expresión de P-FAK (Y397/925), así como un cambio en su localización, expresándose en patrón de membrana. A su vez, estos hallazgos se acompañaron de una normalización en los niveles de Bax y Bcl-2, así como de la actividad de caspasas-3 y -9. Tal vez estos hechos estén mediados por la FAK.

6.- En las condiciones de nuestro trabajo, la administración de inhibidor de caspasas (PCI) produjo una inhibición de la acantólisis, con normalización de los niveles de Bax/Bcl-2 y de la actividad de caspasas-3 y -9. Esto sugiere que la activación de caspasas, sin necesidad de que se complete el resto de la cascada de la apoptosis, sería necesaria para que la acantólisis se produzca.