

Departamento de Dermatología
CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA



Implicación de ADAM10 en la acantólisis del pénfigo vulgar en un modelo murino

Marta Ivars Lleó

Pamplona, 20 de Diciembre de 2019

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Agustín España y de la Dra. María Jesús López Zabalza en el Departamento de Dermatología de la Clínica Universidad de Navarra.

Pamplona, 20 de Diciembre de 2019

Vº Bº de los directores del trabajo:

Dra. María Jesús López Zabalza

Dr. Agustín España Alonso

Estas investigaciones han sido realizadas
con la ayuda de la beca PIUNA otorgada
por la Universidad de Navarra

Son muchas las personas que me han acompañado y ayudado durante la realización de este trabajo. A todas ellas quiero expresar mi agradecimiento.

A la Universidad de Navarra, y en especial a la Clínica Universidad de Navarra, por la formación académica y humana que me han dado.

Al director de esta tesis, el Dr. Agustín España y a la codirectora, la Dra. M^a Jesús López Zabalza. Su rigor científico, dedicación y estímulo constante durante la elaboración de este proyecto, han hecho fácil lo difícil.

A todas las personas del Departamento de Dermatología de la Clínica Universidad de Navarra (de Pamplona y de Madrid) que me han apoyado y animado a lo largo de este recorrido; los doctores: Pedro Redondo, Pilar Gil, Leyre Aguado, Irene Palacios, María Huerta, Javier García, Ester Moreno; los residentes: Nuria Rodríguez, Alejandra Tomás, Ángela Estenaga y Javier Antoñanzas; el resto de personal del Departamento de Dermatología (de Pamplona y Madrid): Estíbaliz, Cristina, Gloria, Beatriz, Isabel, Sole, Rita, Ana, Sara, Merce, Amparo y Teresa.

No puedo olvidar a la Dra. Mairer Pretel, la Dra. Isabel Bernad, al Dr. Miguel Lera, la Dra. Isabel Irarrazábal, a Carmen Elarre y a Marina Sanz.

A Pilar Alzuguren, por su ayuda y disponibilidad incondicional en el trabajo de laboratorio.

A Beatriz Pelacho, del Departamento de Medicina Regenerativa del CIMA y al Dr. Juanjo Lasarte del Departamento de Inmunología del CIMA, por su ayuda.

A la facultad de Medicina de la UAB, por estimular mi pasión por la Dermatología.

A mi gran familia y amigos, por su ánimo constante durante estos años.

A mis padres

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo (s)
Ach	acetilcolina
AchR	receptor de acetilcolina
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
Ag	antígeno (s)
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
AR	anfiregulina
BAX	<i>Bcl-2 antagonist X</i>
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2 protein</i>
BP180	<i>bullous pemphigoid antigen 180</i>
BP230	<i>bullous pemphigoid antigen 230</i>
BTC	<i>betacellulin</i>
Caspasas	<i>cysteine-aspartate proteases</i>
Ctx	cetuximab
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	desmoplaquina
Dsc	desmocolina
Dsg1	desmogleína 1
Dsg3	desmogleína 3
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPR	epiregulina
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FAS L	<i>FAS ligand</i>
FAS R	<i>FAS receptor</i>
Fln	filamentos intermedios
FLIP	<i>fadd-like interleucyn 1 beta converting enzyme</i>
FPLC	<i>Fast protein size-exclusion liquid chromatography</i>
g	gramo (s)

GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
Hb-EGF	<i>heparin binding epidermal growth factor-like</i>
H-E	hematoxilina-eosina
HER	<i>human epidermal receptor / human EGFR related</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IF	inmunofluorescencia
IFD	inmunofluorescencia directa
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IgA	inmunoglobulina A
IgE	inmunoglobulina E
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	inmunoglobulina G
IgG-PF	inmunoglobulina G de paciente con PF
IgG-PV	inmunoglobulina G de paciente con PV
IgG-SN	inmunoglobulina G de paciente control
IL	interleucina
KDa	kilodalton
LT regs	linfocitos T reguladores ó supresores
LTh	linfocitos T <i>helper</i>
LTfh	linfocitos T <i>helper</i> foliculares
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEKK1	<i>mitogen-activated protein kinase-kinase 1</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>
nDsg	no desmogleínicos
NK	células <i>natural killer</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
Nos	<i>nitric oxide synthase</i>
NRG	neuroregulina
Ns	signo de Nikolsky

nTreg	células T reguladoras naturales
P	<i>phosphate</i>
P38MAPK	<i>protein 38 matrix adhesion protein kinase</i>
Pa	plasminógeno
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PERK	<i>protein endoplasmic reticulum kinase</i>
PERP	<i>p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>
PF	pénfigo foliáceo
PG	placoglobina
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3'-kinase</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC	<i>phospholipase C</i>
PMP	<i>peripheral myelin protein</i>
PP1	inhibidor de Src
PV	pénfigo vulgar
PVcm	pénfigo vulgar cutáneo-mucoso
PVm	pénfigo vulgar mucoso
RP	proteína recombinante soluble
Sie	sustancia intercelular epidérmica
SN	suero normal (suero de paciente control)
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>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	tirosina quinasa
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Enfermedades ampollosas cutáneas	12
1.2. Pénfigo vulgar	13
1.2.1. Definición	13
1.2.2. Epidemiología	14
1.2.2.1. Incidencia	14
1.2.2.2. Factores genéticos	14
· Complejo mayor de histocompatibilidad	14
· Inmunoglobulinas	15
· Citocinas	16
1.2.2.3. Otros factores	18
1.2.3. Etiopatogenia	18
1.2.3.1. Estructura de la piel	19
1.2.3.2. Uniones intercelulares de la epidermis	19
· Desmosomas	20
· Uniones adherentes	23
· Uniones focales	24
1.2.3.3. Antígenos del pénfigo vulgar. Inmunidad humoral y celular	24
· Inmunidad humoral	24
▪ Autoinmunidad frente a la desmogleína 3	25
▪ Autoinmunidad frente a los antígenos no desmogleínicos en el pénfigo vulgar	28
· Inmunidad celular	33
1.2.3.4. Mecanismos potenciadores de la enfermedad	36
· Papel del complemento	36
· Papel del sistema del plasminógeno-plasmina	37
1.2.3.5. Vías de señalización intracelular y mecanismos moleculares	37
· EGFR	37
· Familia ADAM	41
· Otras vías de señalización	43

▪ Src	43
▪ FAK	45
1.2.3.6. Cambios en el citoesqueleto	46
1.2.3.7. Apoptosis	49
1.2.4. Teorías etiopatogénicas en el pénfigo vulgar	51
1.2.4.1. Teoría compensatoria	51
1.2.4.2. Teoría de la disrupción física	52
1.2.4.3. Teoría sobre la inducción de la apoptosis a través de los anticuerpos	53
1.2.4.4. La hipótesis del “encogimiento de las células basales”	53
1.2.4.5. Teoría de la apoptolisis	54
1.2.4.6. Teoría de las múltiples vías patogénicas de señalización	55
1.2.5. Manifestaciones clínicas	55
1.2.6. Diagnóstico	58
1.2.6.1. Histopatología	58
1.2.6.2. Inmunofluorescencia indirecta y directa	59
1.2.6.3. <i>Immunoblot</i> e inmunoprecipitación	61
1.2.6.4. ELISA	62
1.2.7 Pronóstico	62
1.2.8 Tratamiento	62
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1 Obtención de los sueros	72
3.2. Caracterización de los sueros	74
3.2.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	74
3.2.2 ELISA de Dsg1 y Dsg3	74
3.2.3 ELISA de Dsc2 y Dsc3	76
3.3. Purificación de los sueros	77
3.4. Modelo de experimentación animal: transferencia pasiva	78
3.5. Características de los inhibidores	80
3.6. Técnicas histológicas	82
3.7. Método de extracción de proteínas y medición de la concentración de Bradford	85

3.7.1 Medición de la actividad de ADAM10	87
3.7.2 Medición de los niveles de EFG y betacelulina	89
3.8. Estadística	91
4. RESULTADOS	93
5. DISCUSIÓN	115
6. CONCLUSIONES	137
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
8. ANEXO	187

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades ampollosas cutáneas

Clásicamente se divide a las enfermedades ampollosas cutáneas en dos grandes grupos: por un lado, estarían las enfermedades ampollosas secundarias a trastornos genéticos o genodermatosis y por otro las enfermedades ampollosas de origen autoinmune (Diaz and Giudice, 2000). Las enfermedades ampollosas autoinmunes se caracterizan por la producción de autoanticuerpos (autoAc) circulantes, predominantemente de tipo IgG, frente a distintos antígenos (Ag) de las uniones intercelulares o de la unión dermo-epidérmica. Clínicamente, las genodermatosis suelen manifestarse desde el nacimiento, pero las autoinmunes pueden hacerlo en cualquier etapa de la vida. Las enfermedades ampollosas autoinmunes se clasifican a su vez en función del plano de localización de la ampolla, en intraepidérmicas y subepidérmicas.

ENFERMEDAD	ANTÍGENO IMPLICADO
Intraepidérmicas <u>Pénfigo superficial</u> <ul style="list-style-type: none">· Pénfigo foliáceo· Pénfigo eritematoso· Pénfigo foliáceo endémico o <i>Fogo Selvagem</i>· Pénfigo IgA <u>Pénfigo profundo</u> <ul style="list-style-type: none">· Pénfigo vulgar· Pénfigo vegetante· Pénfigo paraneoplásico	Dsg1 Dsg1, Dsc1 Dsg3 o Dsg3 + Dsg1 Dsg3 + Dsg1 Plaquinas
Subepidérmicas Penfigoide ampolloso <ul style="list-style-type: none">· Penfigoide <i>gestationis</i>· Penfigoide de mucosas· Dermatitis herpetiforme· Enfermedad IgA lineal· Epidermolísis ampollosa adquirida	BP180 o BP180 + BP230 BP180 o BP180 + BP230 BP180, laminina 332, integrina $\alpha 6\beta 4$ Desconocido (transglutaminasa) Antígeno 97-kDa Colágeno VII

Tabla 1: Clasificación de las enfermedades ampollosas adquiridas

1.2 Pénfigo vulgar

1.2.1 Definición

Todos los tipos de pénfigo descritos pertenecen al grupo de enfermedades ampollosas autoinmunes adquiridas por lo que comparten la presencia de autoAc plasmáticos circulantes dirigidos contra Ag específicos de la epidermis. Cuando los anticuerpos (Ac) circulantes se unen a los Ag diana de la epidermis, se produce una activación de mecanismos no del todo conocidos que conducen a la ruptura de los desmosomas ocasionando como resultado final, la separación de los queratinocitos. Clínicamente estos acontecimientos moleculares se reflejan en forma de ampollas y erosiones tanto en la piel como en las mucosas.

Tradicionalmente se ha clasificado al pénfigo (véase **Tabla 1**) en función de la localización de la ampolla dentro de la epidermis, y se distinguen dos grandes grupos: los pénfigos superficiales, entre ellos el pénfigo foliáceo (PF), y los pénfigos profundos, entre los que destaca el pénfigo vulgar (PV) que será el objeto de este estudio. En los pénfigos superficiales la acantólisis tiene lugar en la capa granulosa de la epidermis, mientras que en los profundos ésta se origina en la zona suprabasal (por encima de la capa de queratinocitos basales). Existen otras formas de pénfigo más infrecuentes, como el pénfigo herpetiforme, con criterios diagnósticos que tienen que ser más aceptados (Kasperkiewicz, 2019; Costa, Cappel and Keeling, 2019).

Existen dos formas de presentación clínica en el PV: la forma mucosa y la forma cutáneo-mucosa, dependiendo de la localización y del número de lesiones. Para considerar que un paciente tiene un PV subtipo mucoso es preciso que presente lesiones principalmente en la mucosa oral y una afectación limitada en la piel (no más de 5-6 lesiones costrosas, erosiones o ampollas con diámetro inferior a 5 cm). Si el paciente, además de erosiones en la mucosa oral tiene en piel más de 6 lesiones y el diámetro de éstas es mayor de 5 cm es considerado del subtipo cutáneo-mucoso. Cada una de estas formas, tiene un pronóstico y un tratamiento distinto. Desde el punto de vista molecular, los pacientes con PV mucoso presentan Ac dirigidos frente a la desmogleína (Dsg) 3, mientras que los que presentan la forma cutáneo-mucosa desarrollan Ac frente a la Dsg1 y 3 (Amagai *et al.*, 1999; Kridin, 2018b).

1.2.2 Epidemiología

1.2.2.1 Incidencia

Aunque la incidencia del PV es baja (1-5 casos por millón de habitantes/año) su valor es variable en función de la población estudiada (Kridin, 2018b).

El PV es mucho más frecuente en la población de origen judío y en japoneses. En Jerusalén se estima que su incidencia es de 1,6 casos por cada 100.000 habitantes (Alpsoy, Akman-Karakas and Uzun, 2015) pero en los países donde este grupo racial es porcentualmente reducido, como por ejemplo en Finlandia, la incidencia no supera los 0,76 casos por 1.000.000 de habitantes. La edad media del diagnóstico de la enfermedad está en torno a los 50 y 60 años. Formas de PV juvenil (en adultos jóvenes menores de 30 años) son más raras y muestran una afectación preferencial por la mucosa oral. El pénfigo neonatal es una forma transitoria y rara de pénfigo que se produce como consecuencia de la transmisión placentaria de autoAc contra el feto de una madre con la enfermedad. No existen claras diferencias entre sexos (Brenner and Wohl, 2007) aunque en algunos estudios se ha descrito un mayor predominio en mujeres (1,5:1) (Zhu *et al.*, 2014; Alpsoy, Akman-Karakas and Uzun, 2015).

En diversos estudios realizados en España en los últimos años (Coronel-Pérez *et al.*, 2009; Alcaide-Martín *et al.*, 2010), el 80% de los pacientes diagnosticados de pénfigo presentaron PV. Al igual que en otros países, no hay diferencias significativas de prevalencia entre sexos. El debut de la enfermedad generalmente ocurre entre los 30 y 60 años, y las zonas anatómicas más frecuentemente afectadas son la mucosa oral, el tronco y el cuero cabelludo.

1.2.2.2 Factores genéticos

· Complejo mayor de histocompatibilidad

El hecho de que algunas personas presenten una mayor predisposición para desarrollar la enfermedad podría estar en relación con determinados haplotipos de HLA. En concreto, se sabe que entre los judíos Askenazi con PV predomina el HLA-DR4 (Ahmed *et al.*, 1990) y que en otros grupos étnicos predomina el HLA-DRw6. Otro estudio ha demostrado que existe una fuerte asociación del HLA-DRB1*04 con el PV en la población pakistaní.

En un estudio en caucásicos e indoasiáticos se confirmó la asociación con los alelos HLA DRβ1*0402 y DRβ1*1404 y DQβ1*0302 y 0503 (Saha *et al.*, 2010) y además se ha descrito que el alelo DRβ1*1454 puede tener también una relación directa con el desarrollo de lesiones de PV. Entre la población japonesa los HLA asociados a la susceptibilidad de desarrollar PV se encuentran HLA-DR4 (DRβ1*0406) y HLA-DR14 (DRβ1*1401, DRβ1*1405, DRβ1*1406) (Yamamoto *et al.*, 2011).

En otro estudio con pacientes caucásicos e indoasiáticos se ha confirmado la asociación con los alelos HLA DRβ1*0402, y HLA DRβ1*1404, DQ β1*0302 y DQ β1*0503 (Saha *et al.*, 2010); interesantemente, también se describe un nuevo alelo DRβ1*1454.

En un metanálisis se sugiere que los alelos DRB1*04, DRB1*08 y DRB1*14 se asocian de forma estadísticamente significativa con el desarrollo de PV (Yan, Wang and Zeng, 2012). Otros trabajos hablan también de la existencia de alelos protectores para la enfermedad como el DQβ1*02, DRβ1*0301, DRβ1*07 y el DQA1*0501 (Loiseau *et al.*, 2000).

En la población española, el PV se asocia de forma preferencial con el HLA-DRB1*0402, mientras que el HLA DRB1*13 parece conferir un efecto protector en nuestra población (González-Escribano *et al.*, 1998).

· Inmunoglobulinas

Se piensa que el perfil de Ac circulantes en el PV podría estar determinado genéticamente. A esta conclusión apuntan los resultados de diversos estudios realizados en la India y en el Norte de Europa, en los que se ha identificado una diferente proporción de pacientes con Ac anti-Dsg1 (Harman *et al.*, 2000). Del mismo modo, la sospecha de esta implicación de la carga genética en la aparición del PV se apoya también en el hallazgo de Ac anti-Dsg entre los familiares de pacientes diagnosticados de PV (Torzecka *et al.*, 2007). No obstante, el número de casos publicados con PV familiar es bajo (Eskiocak, Ozkesici and Uzun, 2016). Otros estudios también apuntan a que la respuesta humoral frente a las Dsg (Payne *et al.*, 2005) así como el potencial patogénico de la IgG anti-Dsg (Qian *et al.*, 2007) podrían estar condicionadas genéticamente. Con respecto a los subtipos de inmunoglobulinas implicadas, diversos estudios demostraron que IgG4 e IgG1 son los Ac predominantes en el PV, con niveles significativamente más altos durante la

fase de actividad. Un estudio sugiere que la IgG4 parece ser el único subtipo que distingue aún más a los subgrupos de pacientes con PV en función de las características clínicas, la duración de la enfermedad y los tipos de HLA (Dhandha, Seiffert-Sinha and Sinha, 2012).

· **Citocinas**

La regulación inmune de la producción de autoAc en el PV es un complejo proceso mediado por citocinas (Pan, Zhu and Xu, 2015). Las células T subtipo *T-helper* (Th) Th1, Th2, Th17 y las células T cooperadoras foliculares (Tfh) se activan cuando las células presentadoras de Ag les presentan la Dsg3 a estas células. Este proceso está restringido por el Ag leucocitario humano (HLA II) DRβ1*04, DRβ1*08 y DRβ1*14. Posteriormente las células T activarán a su vez a las células B por interacción directa o secreción de citocinas (véase **Fig. 1**). Estas citocinas son críticas en la regulación de la función de las células B, y pueden regular positiva o negativamente la activación de las células B autorreactivas. Las células B pueden madurar y desarrollarse en células plasmáticas, que secretarán autoAc de alta afinidad contra Dsg3.

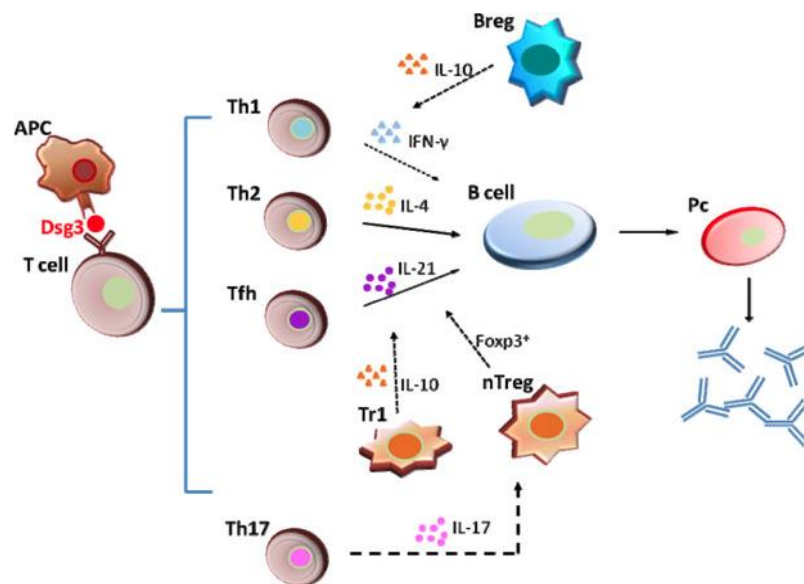


Figura 1: Regulación inmune de la producción de autoAc en el PV (Adaptado de Pan, Zhu and Xu, 2015). APC (células presentadoras de Ag) IFN (interferón) IL (interleucina) nTreg (células T reguladoras naturales).

Las diferencias encontradas entre las subclases de IgG en el PV pueden ser el resultado del desequilibrio existente entre linfocitos Th₁ y Th₂ (Hebert and Joly,

2018). Algunos estudios han detectado un incremento de la actividad Th₁ respecto a Th₂ en el PV (Zillikens *et al.*, 1993), y otros señalan que existe una respuesta de linfocitos Th₂ que reconocen Dsg3 y Dsg1, la cual sería la causante del desarrollo inicial de la enfermedad (Lin *et al.*, 1997). Los linfocitos Th₂, mediante la secreción de citocinas, estimularían a las células B para producir IgG₄. También se ha demostrado que los linfocitos T al reaccionar con la Dsg, sintetizan citocinas propias de Th₁, a excepción de la IL-4 (Kricheli *et al.*, 2000). Estos hallazgos pueden explicarse por la presencia de una policlonalidad de linfocitos T CD4+, hecho muy factible ya que la Dsg tiene varios segmentos inmunorreactivos. Además, esta variabilidad puede deberse también al curso cambiante de la enfermedad a lo largo del tiempo, alternando fases de mayor actividad Th₁ o Th₂. Cuando es predominante la respuesta Th₂ se produce un aumento de IgG₄, y si lo es la Th₁ se estimula la producción de IgG₁, IgG₂ e IgG₃. Este hallazgo plantea la hipótesis de que la IgG₄ no sea 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.

En el suero de pacientes con PV se ha detectado principalmente un aumento de citocinas Th₂ como IL-6, IL-4 e IL-10, y un descenso de citocinas Th₁ como IL-2 e IFN- γ (Satyam *et al.*, 2009). Es de destacar que la citoquina IL-17a, relacionada con las células Th₁₇, y las citocinas IL-21 e IL-27 asociadas a células Tfh, también se han encontrado elevadas en sueros de pacientes con PV (Hennerici *et al.*, 2016). La IL-10 parece tener un papel dual en el PV (perjudicial durante la enfermedad activa, pero beneficioso para la remisión de la enfermedad) (Cho, Ellebrecht and Payne, 2015). Otros estudios han identificado a la IL-4 como un factor crítico derivado de linfocitos T en la patogénesis del PV (Tavakolpour and Tavakolpour, 2016). Todos estos hallazgos hablan del control de las diferentes citocinas en la síntesis de autoAc en el PV (Amber *et al.*, 2013; Lee, Hong and Kim, 2017).

Recientemente se ha descubierto que niveles alterados del factor de transcripción Nr4a2 en los linfocitos T CD4+ se asocian con el desarrollo de PV. Nr4a2 puede

contribuir a la patogénesis del PV mediante la regulación negativa de la actividad de Th2 y la secreción de citocinas relacionadas con Th2 (Chen *et al.*, 2018).

1.2.2.3 Otros factores

Diversos factores han sido implicados como posibles factores etiopatogénicos en el PV, entre otros; la radiación ultravioleta B (Reis *et al.*, 2000), la radiación ionizante (Aguado *et al.*, 2009), el estrés, determinados fármacos (Brenner and Goldberg, 2011) y diversos tumores en el caso de pénfigo paraneoplásico. Entre los casos publicados de pénfigo asociados a fármacos destacan la penicilamina, la penicilina, o fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) (Gornowicz-Porowska *et al.*, 2015) y los β -bloqueantes (Pietkiewicz *et al.*, 2015).

Habitualmente, estos casos de PV suelen tener buen pronóstico, y suelen desaparecer o mejorar tras la retirada de la noxa que indujo el cuadro clínico. Con respecto a las infecciones, se han publicado algunos casos de PV asociados a la infección concomitante diversos virus (Ruocco *et al.*, 2014). Se desconoce si la asociación es causal o si realmente estas infecciones pueden ser inductoras de la enfermedad. Se ha planteado también la hipótesis de que superantígenos procedentes de la *Cándida*, del *S. pyogenes* o de algunas cepas del estafilococo puedan provocar una activación policlonal de células T CD4+ implicadas en la patogenia del PV (Dar *et al.*, 2011).

1.2.3 Etiopatogenia

Son muchos los descubrimientos que se han producido en los últimos años, a pesar de que el mecanismo por el cual se produce la acantólisis suprabasal no es del todo bien conocido. Por otra parte, la acantólisis suprabasal no es un hallazgo patognomónico del PV, ya que, en otros procesos genéticos como la enfermedad de Hailey-Hailey, puede encontrarse también.

Entre los diferentes procesos implicados en la fisiopatogenia del pénfigo destacan la producción de autoAc que se unen a diversos Ag (Dsg3, receptores de la acetilcolina, etc.); mecanismos potenciadores de la respuesta inflamatoria (proteasas, sistema del complemento, etc.) que favorecen la acantólisis; participación de varias vías de señalización intracelular y activación de diversas moléculas señalizadoras (EGFR, PI3K, Src, PKC, mTOR, FasL, FAK, etc.).

Para comprender los mecanismos fisiopatogénicos del PV, es preciso conocer la estructura de la piel, los diferentes tipos de uniones intercelulares y la función específica de cada una de estas uniones en el mantenimiento de la cohesión epidérmica.

1.2.3.1 Estructura de la piel

El estudio histológico de la piel ha permitido conocer sus 3 capas bien diferenciadas: epidermis, dermis e hipodermis, que le confieren sus diferentes funciones (termorregulación, protección, sentido del tacto, secreción, etc.). La epidermis es un tejido poliestratificado y autoregenerativo de entre 120 y 200 μ de espesor. Consta de 4 o 5 capas que proceden de la capa basal que tras multiplicarse y diferenciarse se queratinizan y ascienden para ser eliminadas en la capa más superficial. Sus capas, de la más interna a la más externa son la capa basal, capa espinosa, capa granulosa, estrato lúcido (exclusivamente presente en palmas y plantas) y capa córnea. Las dos primeras corresponden a la epidermis metabólicamente activa (cuerpo mucoso de Malpighio) y las otras tres corresponden a la metabólicamente inactiva. La epidermis es un epitelio que carece de vasos y nervios, pero contiene dos tipos de anejos: unos glandulares (glándulas sebáceas y sudoríparas) y otros queratinizados (uñas y pelos). La epidermis además de queratinocitos tiene otros tres tipos celulares; los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans.

1.2.3.2 Uniones intercelulares de la epidermis

Como tejido vivo, la epidermis presenta estructuras especializadas (véase **Fig. 2**) que permiten tanto la correcta unión intercelular como la comunicación entre ellas. Estas uniones celulares especializadas son de tres tipos; las de anclaje, las ocluyentes (o *tight junctions*) y las de comunicación (o uniones *gap*). Las uniones de anclaje constituyen el principal objeto de nuestra atención, y a su vez se subdividen en uniones adherentes, uniones focales, los desmosomas (*maculae adherens*) y los hemidesmosomas. Las uniones de anclaje son capaces de fijar las células entre sí, y a la matriz extracelular. Estas uniones están constituidas por 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).

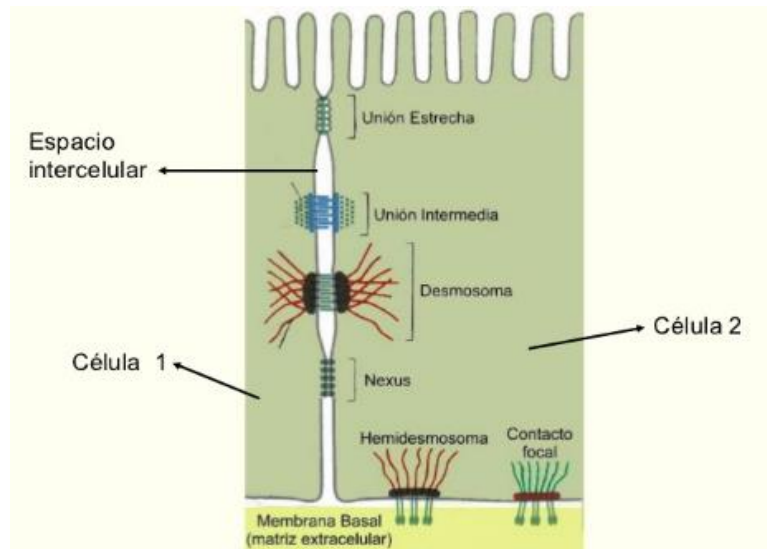


Figura 2: Esquema de los principales tipos de uniones intercelulares

· Desmosomas

Los desmosomas son las estructuras proteicas que permiten la adhesión entre los queratinocitos. Son las estructuras de adhesión más importantes y abundantes de la epidermis. Característicamente, además de estar presentes en toda la epidermis, su número y tamaño se incrementa exponencialmente a medida que los queratinocitos migran desde los estratos profundos hacia los más superficiales. Los desmosomas dan integridad a la célula porque facilitan la unión entre FIn de queratina del citoesqueleto y la membrana celular. Los desmosomas son uniones calcio-dependientes, por lo que en cultivos de queratinocitos sometidos a situaciones de hipocalcemia se observa una alteración de la organización entre queratinocitos. Los desmosomas están constituidos por dos placas electrodensas intracelulares adheridas al borde interno de la membrana plasmática -de cada célula- y unidas entre sí por una banda electrodensa lineal extracelular (desmoglea) localizada entre las dos membranas plasmáticas celulares (véase **Fig. 3**). Desde el punto de vista ultraestructural, los desmosomas están constituidos por dos tipos de proteínas que están en íntima conexión. El primer tipo corresponde a proteínas transmembrana que están formadas por tres dominios (extracelular, transmembrana e intracitoplasmático). El segundo tipo son las proteínas intracitoplasmáticas.

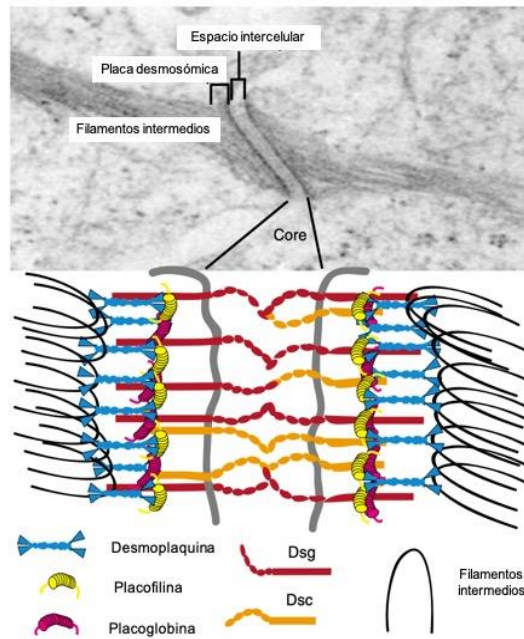


Figura 3: Composición ultraestructural mediante microscopio electrónico de barrido de la unión desmosómica (Kottke, Delva and Kowalczyk, 2006).

Las proteínas transmembrana se denominan cadherinas y característicamente necesitarán calcio para realizar su función de adhesión. Las cadherinas que constituyen las uniones adherentes se llaman cadherinas clásicas o E-cadherinas, y el otro subtipo, las cadherinas desmosómicas, formará parte de los desmosomas. Las cadherinas desmosómicas son glicoproteínas transmembrana tipo I (región amino-terminal extracelular y región carboxi-terminal intracelular) y se caracterizan por presentar cuatro porciones repetidas en su porción extracelular y una adicional en su región carboxi-terminal intracelular. Se dividen en dos grupos: Dsg y desmocolinas (Dsc).

Existen cuatro formas 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 Dsg1, 130-kDa la Dsg3 y 107,8-kDa la Dsg4 (Nagasaka *et al.*, 2004). La Dsg1 y Dsg3 se encuentran casi exclusivamente en los epitelios estratificados y la Dsg4 en la matriz del pelo, así como en capas suprabasales de la epidermis (Mahoney *et al.*, 2006). La Dsg2 tiene una expresión más difusa, apareciendo en todos los tejidos que tienen desmosomas, incluido el miocardio (Schäfer, Koch and Franke, 1994).

La distribución de los distintos subtipos de Dsg no es uniforme en todo el espesor de la epidermis. La Dsg1 se expresa de forma creciente según va madurando el queratinocito, siendo mayor su expresión en las capas superiores de la epidermis. Por el contrario, la expresión de la Dsg3 es mayor en los estratos inferiores, siendo casi indetectable en los superiores (Iwatsuki *et al.*, 1995). Con respecto a las mucosas, resulta interesante el hecho de que la Dsg1 se exprese con una distribución similar a la de la piel con la excepción de que es prácticamente indetectable en estratos inferiores, mientras que la Dsg3 se expresa en todo el espesor de la mucosa, aunque es mayor en las capas inferiores. (Amagai *et al.*, 1996; Shirakata *et al.*, 1998) (véase **Fig. 4**).

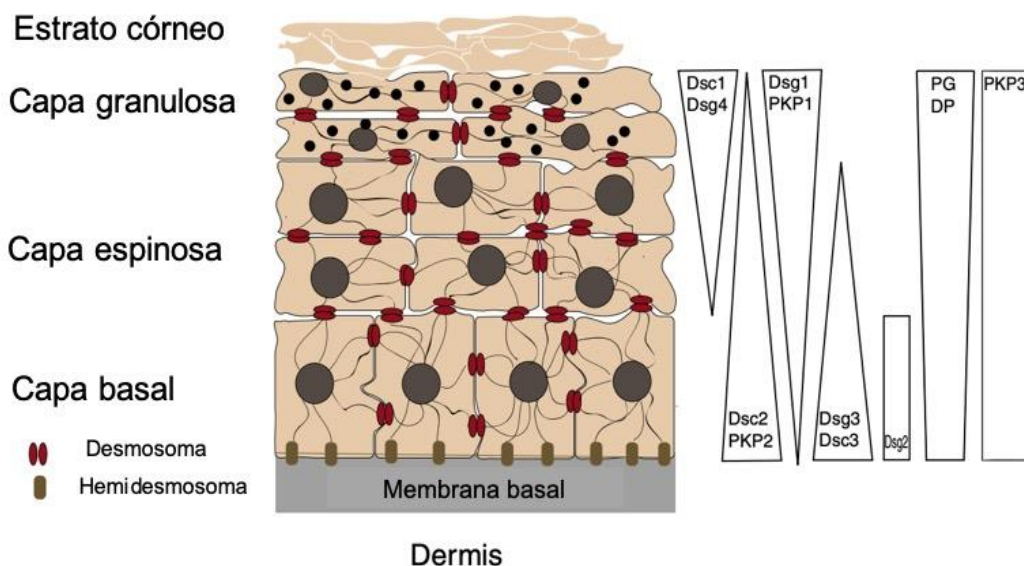


Figura 4: Diferente distribución de los componentes de los desmosomas en la epidermis.

La expresión de las Dsg también es variable según la región anatómica que se estudie. Se sabe que la Dsg3 se encuentra en mayor proporción en la mucosa oral y en el cuero cabelludo, y que la expresión de Dsg1 es mayor en la región facial y tronco superior, siendo ésta última prácticamente indetectable en la mucosa oral. Curiosamente, la Dsg4 se expresa en áreas donde hay una mayor densidad de folículos pilosebáceos (Fujii *et al.*, 2011).

Otra cadherina desmosómica es la Dsc, que es muy semejante a la Dsg. Existen tres isoformas. La Dsc1 suele estar en los estratos más superficiales y maduros de la

epidermis, la Dsc2 en estratos intermedios y la Dsc3 en la capa basal (Legan *et al.*, 1994). La Dsc y la Dsg están íntimamente unidas a la placoglobina (PG) (véase **Fig. 3**).

La PG es una proteína de la placa desmosómica que se expresa en toda la epidermis, pero su expresión aumenta paralelamente a la densidad de los desmosomas, siendo mayor su concentración en capas más superficiales de la epidermis. Esta proteína se une mediante diferentes epítomos a la Dsg y Dsc en un mismo desmosoma y en diferente proporción. Mientras que una molécula de Dsc se une a otra molécula de PG, la molécula de Dsg es capaz de unirse a 6 moléculas de PG (Kowalczyk, Borgwardt and Green, 1996). Se piensa que la PG no es una proteína imprescindible para la estabilidad de las uniones intercelulares, ya que ratones *knockout* para la PG presentan desmosomas morfológicamente normales (Ruiz *et al.*, 1996).

La desmoplaquina (DP), otra de las proteínas que constituyen la placa desmosómica, participa en la unión de los FIn de queratina al desmosoma. Se trata de una proteína que no es exclusiva de los epitelios. A nivel de la epidermis, se expresa en su totalidad, pero existe una mayor proporción de esta proteína en estratos profundos (Arnemann *et al.*, 1993). La DP tiene 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.

Además de las ya comentadas, existen otras proteínas que constituyen la placa desmosómica, y que permiten la unión del desmosoma a los FIn como la placofilina (Smith and Fuchs, 1998), desmocalmina y plectina.

· Uniones adherentes

Las uniones adherentes están constituidas por cadherinas clásicas (E-cadherina y P-cadherina), que al igual que las que constituyen los desmosomas, están formadas por una porción intracelular y otra extracelular. Tienen una proteína en común con los desmosomas, que es la PG y otras específicas que son las cateninas.

Este tipo de uniones sirven de anclaje con las fibras de alfa-actina. Los filamentos de actina que conectan con otras estructuras intervienen en la movilidad celular, cambios de forma y transducción de señales desde la membrana al núcleo.

- **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 que está compuesta por dos subunidades diferentes o heterodímeros (alfa y beta). 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 la 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 alfa-actinina.

1.2.3.3 Antígenos del pénfigo vulgar. El papel patogénico de los Ac IgG y de la inmunidad celular

Hoy en día se postula que en el PV existiría una estimulación amplia del sistema humoral frente a varios Ag. En el PV se calcula que alrededor de 50 Ag órgano-específicos y no órgano-específicos pueden ser dianas en el PV, incluyendo las cadherinas desmosómicas y otras moléculas de adhesión, así como proteínas mitocondriales. O incluso, Ag no epidérmicos (Marchenko *et al.*, 2010; Chernyavsky *et al.*, 2015; Cirillo *et al.*, 2012; Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2011; Kalantari-Dehaghi, Anhalt, *et al.*, 2013).

Los Ac dirigidos frente a los diversos Ag 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 que se explicarán más adelante (Sitaru and Zillikens, 2005; Sharma, Mao and Payne, 2007; Kitajima and Aoyama, 2007)

- **Inmunidad humoral**

Los estudios de inmunofluorescencia (IF) llevados a cabo por Beutner y Jordon en los años 60 del siglo pasado, pusieron la base para entender las enfermedades ampollosas autoinmunes, y en concreto el PV, como una enfermedad de causa inmunológica, mediada por autoAc IgG que el paciente producía frente a Ag específicos (Beutner and Jordon, 1964). Esta hipótesis se vio reforzada por los

experimentos del grupo de Anhalt en 1982, cuando demostraron que la administración a ratones recién nacidos de IgG procedente de pacientes con PV reproducía la enfermedad, clínica, histológica e inmunológicamente (Anhalt *et al.*, 1982). Más tarde algunos autores han observado que los autoAc IgA e IgE pueden unirse a la porción extracelular de la Dsg3, pero su significado sigue siendo incierto (Spaeth *et al.*, 2001). En los últimos años los Ac IgM anti-Dsg3 se han implicado conjuntamente junto a los IgG- en la formación de ampollas del PV (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 and Hertl, 2006) y la presencia transitoria de lesiones de PV en recién nacidos de madres afectas de PV (Ugajin *et al.*, 2007), por la transferencia de IgG vía transplacentaria.

En el PV se han identificados diferentes subclases de IgG, y cada una de ellas parece tener una acción diferente en la enfermedad. 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 han detectado en familiares sanos de pacientes con PV. Otros trabajos previos (Bhol *et al.*, 1995) y otros posteriores (Pan *et al.*, 2011) muestran resultados discordantes a el de Torzecka y cols. ya que comprueban que la IgG1 es la subclase predominante en pacientes con PV en remisión, en controles y familiares sanos. Parece ser que la subclase de IgG más patogénica es la IgG4 (Futei *et al.*, 2001).

· Autoinmunidad frente a la Desmogleína 3

Gracias a las técnicas de inmunoprecipitación, se logró identificar los Ag implicados en el PV. Inicialmente, los estudios de Stanley y cols. (Stanley *et al.*, 1982; Stanley, Koulu and Thivolet, 1984) identificaron dos bandas principales de 130 y 80-kDa cuando utilizaron IgG-PV para inmunoprecipitar extractos de queratinocitos humanos en cultivos marcados con aminoácidos radiactivos y asumieron que eran los Ag diana del PV. Posteriormente, Korman y cols. (Korman *et al.*, 1989) identificaron una banda de 85-kDa que se correspondía con la PG, y observaron que la IgG-PV no se unía directamente a esa proteína, quedando como único Ag diana la

proteína diana de 130-kDa. Amagai y cols. (Amagai, Klaus-Kovtun and Stanley, 1991), mediante *immunoscreening* con IgG-PV purificada, identificaron la proteína de 130-kDa como una nueva Dsg, llamada Dsg3.

Mediante proteínas de fusión que representaban distintas porciones de los dominios extracelulares de la Dsg3 se determinó la principal porción antigénica para el suero de PV, que estaba en los dominios extracelulares EC1, EC2 y EC4 (Amagai *et al.*, 1992). Otros trabajos han demostrado que los Ac dirigidos frente a los dominios EC1 y EC2 se asocian a las fases activas de la enfermedad, por los que se ha sugerido que estas regiones de la Dsg3 guardan un papel más relevante en la adhesión entre los queratinocitos (Müller *et al.*, 2008; Rafei *et al.*, 2011).

La importancia de los Ac anti-Dsg3 en la patogenia del PV quedó también subrayada mediante un experimento de Amagai y cols. en 1994 por el que produjeron una serie de proteínas de fusión con Dsg3, esta vez con una porción de IgG humana expresada mediante un baculovirus en células de insecto Sf9 (Amagai *et al.*, 1994). La absorción de la porción extracelular de los Ac anti-Dsg3 eliminaba la mayor parte de la actividad patogénica del suero del PV, reseñando la importancia de los Ac anti-Dsg3. Para demostrar la patogenicidad de estos Ac, los esplenocitos de los ratones *knockout* para la Dsg3 inmunizados fueron transferidos a ratones Dsg3^{+/+} Rag2^{-/-} (ratones inmunodeficientes). Los ratones huéspedes, tal y como se esperaba, desarrollaron el fenotipo de PV. Tras este experimento se demostró que los Ac anti-Dsg3 podrían tener como diana distintos epítomos en el dominio N-terminal de la molécula y que algunos de esos Ac anti-Dsg3 no eran patogénicos.

Cuando los esplenocitos de los ratones Dsg3^{-/-} inmunizados con Dsg3-hibridomas fueron usados para producir anti-Dsg3, fue posible aislar los clones específicos que producían Ac patogénicos que reaccionaban con la porción EC1 de la Dsg3 (Tsunoda *et al.*, 2003). Esto facilitó los intentos de producir Ac monoclonales humanos de linfocitos periféricos, y se crearon clones productores de Ac anti-Dsg3 patogénicos y no patogénicos.

Otro estudio posterior consiguió desarrollar un nuevo sistema experimental para evaluar la patogenicidad in vivo de los clones individuales de linfocitos T Dsg3-reactivos (Takahashi *et al.*, 2008). En este sistema, las líneas de linfocitos T Dsg3 reactivas generadas in vitro de ratones Dsg3^{-/-} fueron transferidos a ratones

inmunodeficientes Rag2^{-/-} (Dsg3^{+/+}). 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 Dsg3 también pueden producir dermatitis de interfase en el ratón (Takahashi *et al.*, 2011).

Los pacientes con PV cuya afectación clínica predominante es la mucosa (PVM) presentan Ac frente a la Dsg3 y aquellos con afectación cutáneo-mucosa (PVcm) presentan además Ac frente a la Dsg1 (Amagai, Tsunoda, *et al.*, 1999). Curiosamente, 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 Ac anti-Dsg3 de pacientes con afectación cutáneo-mucosa sí lo logran (Amagai *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1997). Se postula que este hecho se deba a que en los pacientes con PVM los Ac frente a la Dsg3 reconocen epítomos patógenos que no se reconocen de igual forma en la Dsg de la epidermis de la piel del ratón. La administración de Ac anti-Dsg1 de pacientes con PVcm tiene la capacidad de inducir lesiones en los ratones recién nacidos (Ding *et al.*, 1999).

La respuesta que presentan los pacientes frente a la Dsg1 y Dsg3 no es siempre la misma, sino que puede ir cambiando a lo largo de la enfermedad, quizá por un fenómeno de *intermolecular epitope spreading*. Este fenómeno propone que inicialmente se produce una respuesta autoinmune frente a la Dsg3 y en algunos casos también frente a la Dsg1 posteriormente, quizás por semejanza molecular entre ambas o bien porque tras la reacción inmunológica inicial se expondrían nuevos Ag epidérmicos, con la consecuente respuesta inmunológica adicional frente a la Dsg1. Esto podría explicar por qué algunos pacientes presentan lesiones únicamente en la mucosa oral (Ac anti-Dsg3) y posteriormente desarrollan lesiones cutáneas (Ac anti-Dsg1 y 3). También se ha objetivado que algunos pacientes sufren una variación clínica de PV a PF con un cambio de perfil de los Ac circulantes, pasando de presentar Ac anti-Dsg3 a presentar solamente anti-Dsg1 (España *et al.*, 2014). Estas observaciones ponen de manifiesto la presencia de uno o varios epítomos comunes entre ambas Dsg (Salato *et al.*, 2005).

Los títulos de IgG anti-Dsg1 y 3 no siempre se correlacionan con la actividad del PV (Abasq *et al.*, 2009) ni siempre predicen la exacerbación de ésta (Akman, Uzun and

Alpsoy, 2010). Este hecho puede deberse a que la respuesta humoral frente a un Ag genera Ac múltiples, con Ac patógenos y no patógenos. Durante la evolución clínica, cuando los pacientes mejoran, pueden desaparecer primero los Ac frente a epítomos patógenos.

· Autoinmunidad frente a antígenos no desmogleínicos en el pénfigo vulgar

Desde luego, de todos los Ag descritos en el PV frente a los cuales se produce una estimulación humoral, los más importantes, en la mayoría de los casos, son la Dsg3 y Dsg1. No obstante, a lo largo de los años se han ido descubriendo también otros Ag diana, algunos de ellos con un potencial patogénico relevante. Nuevos datos demuestran que otros Ac distintos a las Dsg están implicados en la patogenia del PV:

- Presencia de acantólisis suprabasal en ratones *wild* y ratones Dsg3^{null} después de administrarles IgG de pacientes con PV que no presentaban Ac anti-Dsg3. (Amagai *et al.*, 1992; Vu *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2000);
- Presencia de acantólisis suprabasal en pacientes con PV que presentan Ac frente a la epidermis, pero con Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3 negativos, significando que o bien los Ac anti-Dsg no son suficientes para desarrollar acantólisis suprabasal, o que Ac nDsg pueden desarrollar acantólisis también (Cirillo *et al.*, 2012; Spindler and Waschke, 2018; Cozzani *et al.*, 2013; Jamora, Jiao and Bystryn, 2003; Sardana, Garg and Agarwal, 2013);
- A ratones *knockout* para la Dsg3 se les administra suero de PV desprovisto de Ac anti-Dsg1 y desarrollan ampollas en la piel (Kalish, 2001);
- Existen individuos sanos portadores de altas cantidades de Ac anti-Dsg3 en su suero (Torzecka *et al.*, 2007).

Estudios de proteómica (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2013) han permitido descubrir que son numerosos los Ac que pueden unirse a múltiples Ag implicados en el PV. De hecho, estos estudios han demostrado que sólo el 69% de los pacientes con PV presentan Ac frente a la Dsg3. Las dianas antigénicas (distintas a la Dsg3) más frecuentemente implicadas en el PV se muestran en la **Tabla 2**. Un grupo especial de los Ac no desmogleínicos (Ac nDsg) implicados en el PV son aquellos dirigidos contra moléculas de adhesión (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2013; Grando *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2010; Ohzono *et al.*, 2015; Ishii *et al.*, 2015; Müller

et al., 2009a; Mindorf *et al.*, 2017). Recientemente se han publicado algunas revisiones donde se aborda este tema en profundidad (Amber *et al.*, 2018). El rol de estos Ac nDsg no está del todo esclarecido. Se sabe que sólo algunos de ellos participan en la actividad y respuesta al tratamiento (Lakshmi *et al.*, 2017) actuando de forma sinérgica junto a otros Ac IgG para inducir la separación celular (Grando, 2000; Chernyavsky *et al.*, 2019). Globalmente, se desconoce si intervienen directamente en la acantólisis, o si son epifenómenos que tienen lugar tras la separación celular.

Antígenos diana	% en paciente con PV
HLA-DRA	45%
Dsc3	4.5-60%
Dsc1	44%
ATP2C1	43%
PKP3 (Placofilina 3)	25-100%
CHRM3 (Receptor de Ach muscarínico tipo 3)	42-100%
COL21A1 (Colágeno a1, type XXI)	42%
ANXA8L1 (Molécula anexina A8-like)	42%
CD88	42%
CHRNE (Subunidad E del receptor de Ach nicotínico)	41%

Tabla 2: Dianas antigénicas nDsg más frecuentes en pacientes con PV.

Entre los Ac nDsg descritos, los Ac anti-desmocolina (Ac anti-Dsc) han ganado mucha atención en los últimos años por su potencial participación en el PV, aunque los mecanismos por los que están implicados en el PV no se conocen en profundidad. Globalmente, se han identificado Ac anti-Dsc en 25-60% de sueros de pacientes con pénfigos no-clásicos (incluyendo el pénfigo paraneoplásico) (Ishii, *et al.*, 2015) e infrecuentemente en paciente europeos con PV (entre el 4-16%) (Mindorf *et al.*, 2017). Sin embargo, la frecuencia de estos Ac asciende hasta el 44% utilizando técnicas de proteómica (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2013). También recientemente, Ishiii y cols. (Ishii *et al.*, 2015) reportaron el hallazgo de Ac anti-Dsc en distintos subtipos de pénfigo como el PV (13,6%), pénfigo foliáceo (18,8%), pénfigo vegetante (36,8%), pénfigo herpetiforme (35,7%) y sólo en un 6% de controles sanos. La isoforma de Ac anti-Dsc más frecuentemente detectada en los pacientes parece ser

el Ac anti-Dsc3 (entre 4,5-36,8%) (Amber, Valdebran and Grando, 2018). El hecho de que la mayoría de epítomos para Ac anti-Dsc sólo puedan producirse en células de mamíferos, pero no a partir de proteínas recombinantes obtenidas en células de insecto por el sistema baculovirus podría explicar la baja frecuencia de auto-Ac anti-Dsc en PV en algunos estudios (Ishii *et al.*, 2015). No obstante, los expertos recomiendan estudios rutinarios para detectar estos Ac solamente en casos de pénfigo atípicos (Mindorf *et al.*, 2017).

Lo más habitual es que los Ac anti-Dsc se asocien a otros Ac, desarrollando lesiones de PV o adoptando otros fenotipos clínicos de pénfigo, o también asociándose a otras formas de enfermedades ampollosas autoinmunes, bien como una respuesta IgG o también IgA. (Dmochowski *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1995; Mao *et al.*, 2010; Kavala *et al.*, 2012; Hashimoto *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 2015; Kamiya *et al.*, 2016; Ohzono *et al.*, 2015; Ishii *et al.*, 2015; Saruta *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 1994; Inoue-Nishimoto *et al.*, 2016; Hashimoto, 2015; Kozłowska *et al.*, 2003; Ohata *et al.*, 2013; On, Hashimoto and Kim, 2015; Matsukura *et al.*, 2014; Gooptu *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 2013; Kopp *et al.*, 2006; Geller *et al.*, 2014; Bolling *et al.*, 2007).

Sin embargo, otras veces solo se detectan los Ac anti-Dsc con las técnicas diagnósticas hoy disponibles. En estos casos, pueden presentarse también como un PV, o adoptar otros patrones clínicos de pénfigo, y también con una respuesta IgG, IgA o IgG/IgA. En algunos de estos casos se han asociado a neoplasias (Müller *et al.*, 2009b; Mao *et al.*, 2010; Rafei *et al.*, 2011; Hatano *et al.*, 2012; Hong, Hashimoto and Kim, 2016; Tateishi *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2018; Tay, Lee and Lim, 2018; Yamaguchi *et al.*, 2018; Iranzo *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2014; Ansai *et al.*, 2017; Geller *et al.*, 2016; Leventhal *et al.*, 2017; Saruta *et al.*, 2013).

Son diversos los trabajos que proporcionan evidencia de la capacidad patogénica de los Ac anti-Dsc:

- Lo demuestra la formación de ampollas intraepidérmicas en un modelo celular *in vitro* a través de Ac monoclonales anti-Dsc3 (Spindler *et al.*, 2009)
- Se ha detectado que ratones sin Dsc3 desarrollan un fenotipo similar al PV (Chen, Den and Koch, 2008)
- La inmunoadsorción de Ac anti-Dsc3 es capaz de eliminar la actividad

acantolítica en algunos pacientes (Mao *et al.*, 2010)

- Por último, se sabe que los Ac IgG anti-Dsc3 purificados del pénfigo paraneoplásico o bien de un PV sin Ac anti-Dsg pueden inducir acantólisis en cultivos de queratinocitos (Ishii *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2010; Rafei *et al.*, 2011; Kamiya *et al.*, 2016)

Se desconoce cómo los Ac anti-Dsc pueden actuar en el PV. Tal y como mencionamos más arriba, la sola presencia de estos Ac puede inducir acantólisis suprabasal en algunos pacientes, especialmente aquellos dirigidos frente a la Dsc3. Se ha postulado que inducen la acantólisis debido a un efecto directo en el queratinocito como consecuencia de su unión a la molécula diana o bien por poner en marcha diferentes vías de señalización intracelular (Sitaru and Zillikens, 2005). De forma interesante, en pacientes con PV que asocian Ac anti-Dsg1/3 y anti-Dsc, solamente estos últimos inducen las lesiones en la epidermis, mostrándose una correlación entre la internalización de la Dsc y la aparición de acantólisis suprabasal (Kamiya *et al.*, 2016). Estos hallazgos muestran que probablemente la presencia de Ac anti-Dsc en el PV pueden ser realmente los inductores de las lesiones, a pesar de la presencia de Ac anti-Dsg. No obstante, este punto necesita más evidencias. Además, es necesario saber si la presencia adicional de Ac anti-Dsc establece un fenotipo clínico de PV diferente al observado en pacientes con PV solo Ac anti-Dsg, y saber porqué la presencia de Ac anti-Dsc parece inducir un fenotipo clínico de PV más agresivo (Makino *et al.*, 2015; Kamiya *et al.*, 2016). Además, diferentes mecanismos intracelulares *downstreaming* tras la unión de los Ac anti-Dsg3 y anti-Dsc3 a sus respectivos Ag, podrían conducir, rápidamente, a la misma acantólisis suprabasal histológica (Mao *et al.*, 2010).

Dentro de los Ac nDsg se han descrito también Ac frente a la proteína hSPCA1, codificada por el gen ATP2C1, e implicada directamente en la enfermedad de Hailey-Hailey, hasta en el 43% de los sueros de pacientes con PV (Kalantari-Dehaghi, Anhalt, *et al.*, 2013). Se desconoce su papel en la acantólisis suprabasal.

Los Ac frente a los receptores colinérgicos se han implicado también en el PV. Se sabe que los queratinocitos humanos contienen una elaborada red no neuronal de acetilcolina (Ach) 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-matriz al igual que en la migración celular (Grando, 2006). En este sentido, 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) y que la aplicación de agonistas colinérgicos como la pilocarpina tienen efecto terapéutico en las lesiones orales y cutáneas de pacientes con PV (Iraji and Yoosefi, 2006). Mediante diferentes técnicas proteómicas se ha identificado subtipos diferentes de receptores colinérgicos dianas en el PV (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2011). Ac frente mAChR se han descrito entre el 85-100% de los pacientes con PV (Lakshmi *et al.*, 2017). Su eliminación del suero evita la aparición de acantólisis, pero su sola presencia no induce tampoco la enfermedad (Nguyen, Ndoye and Grando, 2000). Su acción sería sinérgica junto a otros autoAc (Grando, 2000).

En relación con estos últimos, se ha observado también en el suero de los pacientes con PV Ac frente a proteínas de las mitocondrias (Marchenko *et al.*, 2010). Estos Ac se tienen que acoplar al receptor neonatal Fc (FcRn) de la membrana celular (Chen *et al.*, 2015) para después penetrar en el interior de la célula y producir, de forma coordinada con los Ac anti-Dsg1 (Marchenko *et al.*, 2010), acantólisis, oxidación celular (Yesilova *et al.*, 2013; Naziroğlu *et al.*, 2003; Arredondo *et al.*, 2005) favorecer la contracción de citoesqueleto celular en las células acantolíticas (Chen *et al.*, 2015), y activar vías de apoptosis que se producen dentro de la célula acantolítica (Pelacho *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2012).

Otros Ac nDsg que se han descrito en el PV, son los Ac anti-placofilina (Bonné *et al.*, 2003) (Lambert *et al.*, 2010); Ac anti-E-cadherina (Evangelista *et al.*, 2008); anti-placoglobina (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2013); Ac anti-FcRI (Fiebiger *et al.*, 1998); Ac anti-anexinas y anti-penfaxina (Nguyen, Ndoye and Grando, 2000). También se han detectado en este grupo de pacientes con PV, Ac no epiteliales propiamente, como los Ac anti-cardiolipina IgM, anti-reticulina IgG y anti-gliadina IgG (Mejri *et al.*, 2011), Ac anti-tiroideos (Pitoia *et al.*, 2005; Michailidou *et al.*, 2007; Ansar *et al.*, 2009; Daneshpazhooh *et al.*, 2010; Leshem *et al.*, 2011; Kavala *et al.*, 2012; Ameri *et al.*, 2013; Parameswaran *et al.*, 2015) o también Ac contra Ag órgano no específico

como el TNF y la NADH deshidrogenasa-proteína-like (Marchenko *et al.*, 2010); FAS-R (receptor de Fas) (Pan *et al.*, 2011) y PERP (PERP pertenece a la familia de proteínas PMP-22, y está implicada en la estabilidad del desmosoma) (Bektas and Rubenstein, 2009).

Así pues, la respuesta humoral en los pacientes con PV puede ser en algún caso más amplia de lo esperado en un primer momento. De todas las posibles combinaciones de Ac, se ha observado que la que con más frecuencia se observa es aquella que combina, además de Ac anti-Dsg, al menos una molécula de adhesión celular como Dsc1, Dsc3 o placofilina 3, con o sin Ac AchR (Kalantari-Dehaghi *et al.*, 2013).

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que el papel de los Ac nDsg es relevante para inducir lesiones de PV. La administración a ratones de IgG-PV sin anti-Dsg (anti-Dsc3 + anti-AchR + anti-hSPCA1) produjo acantólisis suprabasal. La eliminación de uno de ellos suprimió este efecto, de lo que se deduce su efecto patógeno, y la necesidad de sinergia entre ellos para desencadenar el daño en la epidermis (Chernyavsky *et al.*, 2019).

Todos estos hallazgos ponen de manifiesto que la patogenia del PV puede ser más complicada y variada de lo que en un primer momento se pensó, fruto de una desregulación inmunológica, y que se pondría de manifiesto en algunos casos por la asociación de otras enfermedades autoinmunes asociadas (Mejri *et al.*, 2011).

No obstante, el mecanismo patogénico de las lesiones cutáneas del PV cuando coinciden varios de estos anticuerpos nDsg quedan todavía por definir.

La descripción reciente de pacientes que desarrollan lesiones histológicas, y en alguna ocasión también clínicas, de acantólisis suprabasal durante el tratamiento con fármacos del grupo de inhibidores del *check-point*, realza aún más el papel patogénico que podrían tener disregulaciones en la inmunidad humoral a la hora de desencadenar este tipo de procesos (Chen *et al.*, 2018).

· Inmunidad celular

La presencia de niveles elevados de ciertas IL entre las que se encuentra el factor soluble del receptor de la IL-2 (rIL-2s) (Zillikens *et al.*, 1993), la IL-15 y la IL-10 (Toto *et al.*, 2000), sentaron las bases de la participación de la inmunidad celular en

el PV. Su papel ha sido estudiado principalmente en cómo puede intervenir en la síntesis y regulación de los Ac anti-Dsg.

La regulación en la producción de Ac frente a Dsg1 y 3 se basa en la cooperación entre linfocitos T y 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 (Eming *et al.*, 2008). El factor que determina quién desarrolla PV y quién no, es la presencia de linfocitos T reguladores (LTregs) capaces de suprimir la respuesta inmunitaria en aquellos que no enferman (Hertl *et al.*, 2006). Pero la sola disminución de LTregs en sangre periférica no es válida para explicar la deficiencia de la actividad inmunosupresora en el PV, ya que estos linfocitos se detectan también en las lesiones de PV (Arakawa *et al.*, 2009).

Se ha observado que existen dos subpoblaciones de células presentadoras de Ag 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 *naïve* 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 Ag (Gonzalez *et al.*, 2000).

Otros estudios demostraron que las células NK CD56⁺CD3⁻ están incrementadas en los pacientes con PV activo. Además, cuando se cultivan las células T CD4⁺ de lesiones cutáneas de pacientes con PV activo con células *natural killer* (NK) CD56⁺CD3⁻ se secretaron altos niveles de IL-6 e IL-8 (Stern *et al.*, 2008).

Todos estos estudios ponen de manifiesto un papel relevante de la inmunidad celular en el desarrollo de las diferentes poblaciones de Ac en el PV. Esta producción de Ac 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 perpetuarían la presentación antigénica, la estimulación linfocitaria y finalmente la producción de los Ac. Pero estos datos no los podemos separar del hecho que la autoinmunidad frente a determinados epítopes de Dsg3 puede ser un

acontecimiento normal: la presencia de células B autorreactivas se pone en evidencia al detectar Ac anti-Dsg3 en familiares sanos de pacientes con PV (Torzecka *et al.*, 2007).

Algunos estudios han confirmado el papel central de la estimulación de la Dsg3 como inductor de la producción de Ac, y la generación de células T reguladoras frente a esta Dsg en el PV (Pan *et al.*, 2008). Estos clones celulares serían los artífices de la enfermedad (Takahashi *et al.*, 2008) y su destrucción incompleta haría que el paciente presentara nuevos brotes después de episodios de aparentes mejorías clínicas (Takahashi, 2017). En este proceso tendrían un papel fundamental poblaciones linfocitarias Th17, al igual que en otras enfermedades autoinmunes humorales (Xu *et al.*, 2013).

Hoy en día, el estudio del rituximab (Ac anti-CD20) como tratamiento de muchas enfermedades autoinmunes, y en concreto del PV, nos ha ayudado a entender mejor cómo puede ser la inmunidad celular que media la producción de Ac, principalmente Ac anti-Dsg. Así, las células pre-B expresando CD20 en su superficie, tras la exposición a la Dsg3, harían que células *naive* expresaran en su membrana además IgM anti-Dsg3. Posteriormente, la expresión de IgG anti-Dsg3 en la membrana de esas mismas células las transformaría en células memoria para esta Dsg, con producción posterior de IgG anti-Dgs3 (Colliou *et al.*, 2013)(véase **Fig. 5**).

La expresión de la proteína CD20 en la membrana de las células B hasta su maduración en célula plasmática permitiría el tratamiento con Ac anti-CD20 en estos pacientes.

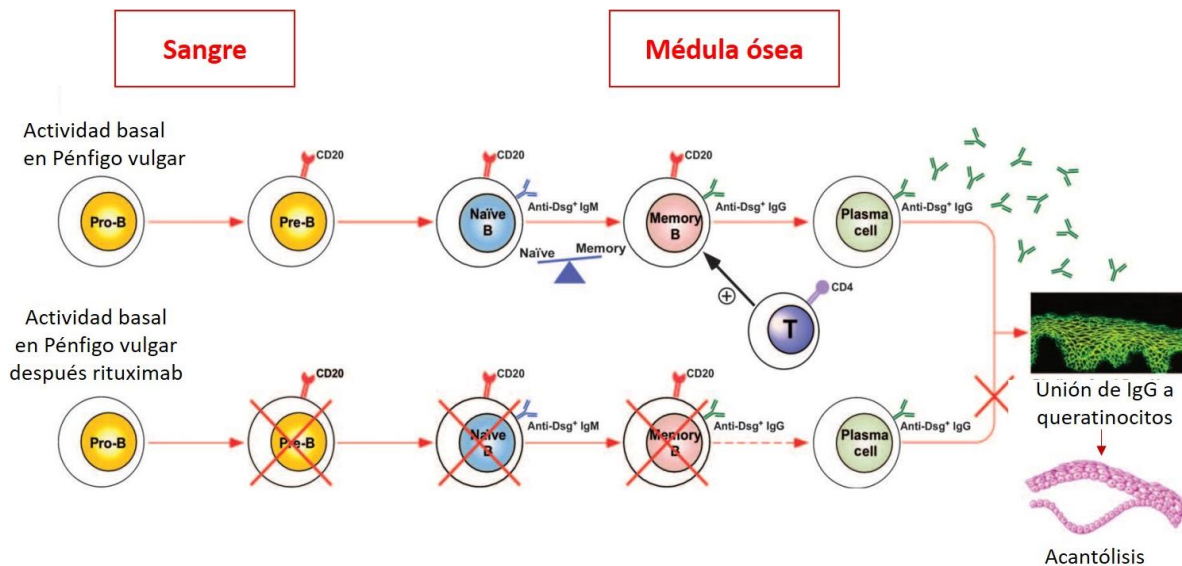


Figura 5. Modelo propuesto de acción del rituximab en pacientes con pénfigo. (Cfr. Colliou *et al.*, 2013)

1.2.3.4 Mecanismos potenciadores de la enfermedad

Aunque los Ac 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 (el complejo de ataque del complemento C5-C9 y la fracción C3). Varios estudios en un modelo murino, anulando el sistema del complemento (con veneno de cobra, utilizando fracciones Fab2 y Fab', o ratones deficientes en C5), han puesto de manifiesto que el complemento sería solo un sistema potenciador de la acantólisis y no como un requisito necesario para producir la misma (Anhalt *et al.*, 1986; Mascaro *et al.*, 1997). La detección de MBL (*mannan-binding lectin*) o lectina de unión a manosa (proteína que pertenece a las colectinas y que juega un importante papel en el sistema inmunitario innato de los mamíferos) en el espacio intercelular y en la zona de la membrana basal y de Ficolina2 (50%) en la zona de membrana basal en las lesiones cutáneas de PV es otro dato que apoya la hipótesis

de que la activación del complemento in situ contribuye al daño tisular en PV (de Messias-Reason *et al.*, 2011).

- **Función del sistema plasminógeno-plasmina**

Algunos trabajos han mostrado que el activador del plasminógeno (uPA) y su receptor (uPAR) están implicados en la acantólisis del PV (Schaefer *et al.*, 1996) (Seishima *et al.*, 1997). Además, el uPAR puede incrementarse por la activación de la proteína-quinasa C (PKC), una vía intracelular que se activa durante la acantólisis (teoría proteolítica) (Kitajima *et al.*, 1999). Sin embargo, su activación se considera un epifenómeno durante la inflamación en la acantólisis (Mahoney *et al.*, 1999; Lanza *et al.*, 2006).

1.2.3.5. Vías de señalización intracelular y mecanismos moleculares

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

- **EGFR**

El epidermal growth factor receptor (EGFR) es un miembro de la familia de receptores de membrana HER (*human epidermal receptor*) y es un importante mediador de la diferenciación, supervivencia, migración, adhesión y crecimiento celular. La familia de receptores de tirosina quinasa (TK) HER (véase **Fig. 6**) está constituida por 4 miembros: EGFR (también llamado HER1, ErbB-1), HER2 (neu, ErbB-2), HER3 (erbB-3) y HER4 (erbB-4) (Ceresa and Peterson, 2014). El EGFR es una glicoproteína transmembrana de 170-kDa. Estructuralmente contiene un dominio extracelular que reconoce y se une a un ligando específico (véase **Fig. 7**) un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio intracelular que contiene una TK con actividad enzimática.

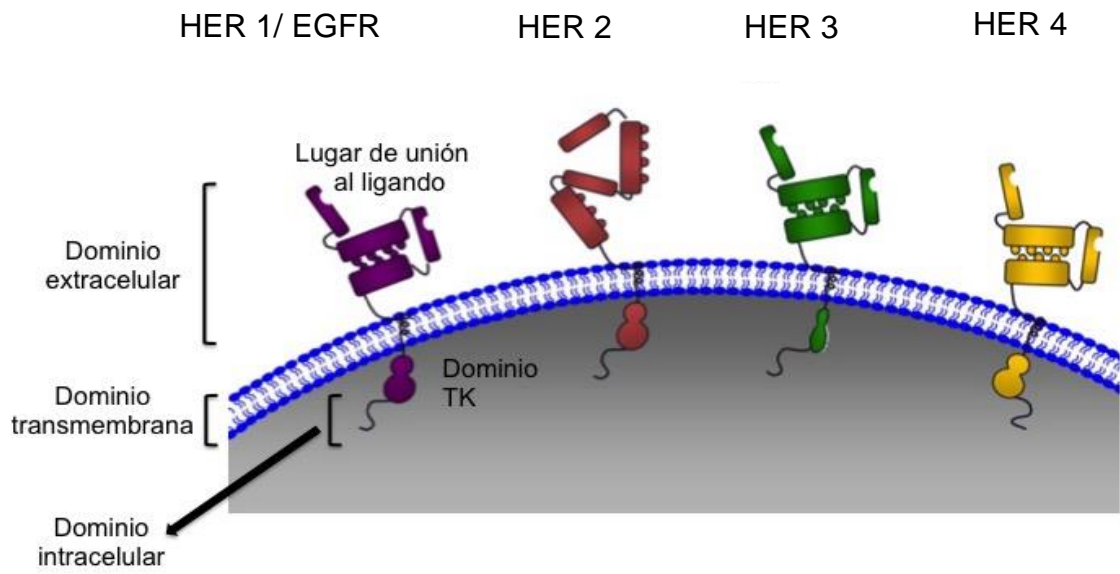


Figura 6: Esquema de los receptores de la familia HER. (Modificado de Yarden and Sliwkowski, 2001).

El HER3, sin embargo, es diferente de los otros miembros de la familia HER ya que carece de dominio TK, aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia de receptores. Al contrario que otros receptores HER, no se ha identificado hasta la fecha ningún ligando para HER2. Sin embargo, el HER2 es el correceptor preferido de HER1, HER3 y HER4 (Klapper *et al.*, 2000).

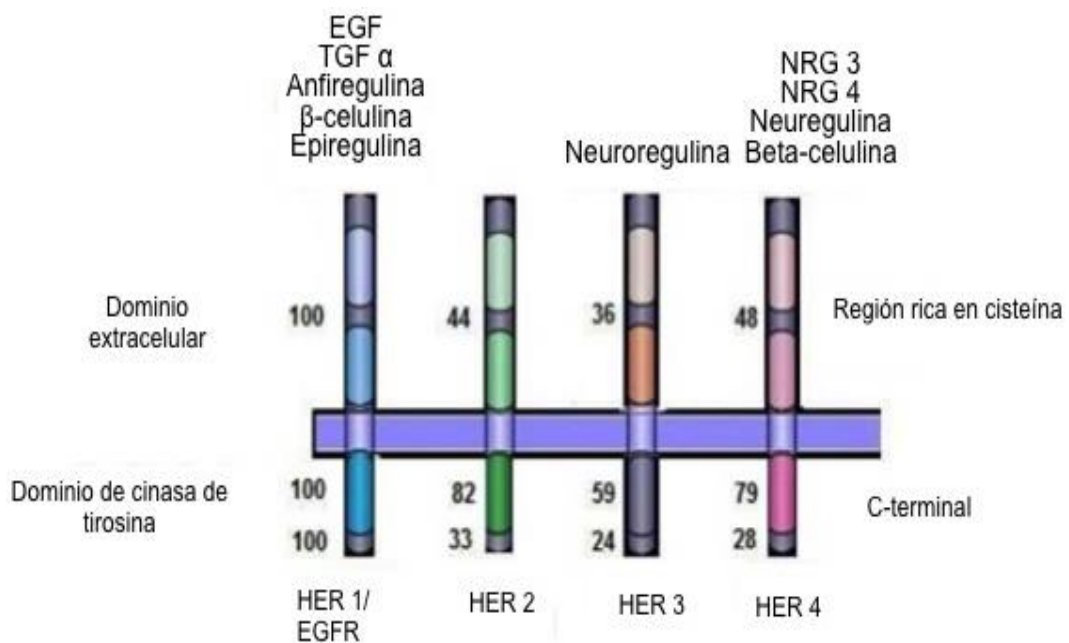


Figura 7: Receptores HER y sus ligandos (HER 2 que no tiene ligando).

Los receptores HER se activan mediante dimerización entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes receptores de la misma familia (heterodimerización) (Ceresa and Peterson, 2014). Después de la dimerización del receptor, se produce una activación de la actividad intrínseca de la proteína TK con la autofosforilación de residuos tirosina intracitoplasmáticos. Estos eventos provocan el reclutamiento y la fosforilación de varios sustratos intracelulares conduciendo señales mitogénicas y otras vías de señalización intracelular (Riese and Stern, 1998; Ceresa and Peterson, 2014).

La vía *Ras-Raf-mitogen activated protein kinase* (Benvenuti *et al.*, 2007), la vía fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) (Muthuswamy, Gilman and Brugge, 1999; Davis *et al.*, 2014) y la fosfolipasa C (PLC)-proteína quinasa C (PKC) (Wee *et al.*, 2015) son las principales rutas de señalización para la familia HER, incluyendo el EGFR (véase **Fig. 8**).

Múltiples vías de señalización adicionales son inducidas a través del EGFR, como la activación de transductores de señales o activadores de proteínas de transcripción como la STAT (o transductor de señal y activador de la transcripción) (Yu and Jove, 2004; Cichocki *et al.*, 2014), la Src -cuya actividad TK se ha demostrado que aumenta en respuesta a la señalización del EGFR- (Ishizawar and Parsons, 2004; Gil *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018), la *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Pretel *et al.*, 2007; Freudlsperger *et al.*, 2011), la óxido nítrico sintasa neural (nNOS) (Marquina *et al.*, 2008) y la quinasa de adhesión focal (FAK) (Gil *et al.*, 2012), entre otras. Estas vías regulan múltiples procesos biológicos, como la expresión génica, proliferación celular, angiogénesis, inhibición de la apoptosis y adhesión celular.

Existen múltiples ligandos de receptores HER que provocan la formación de complejos homo- o heterodiméricos entre los 4 receptores HER (Olayioye *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 2003). Dentro de la familia de ligandos de los receptores HER se distinguen tres grupos funcionales en cuanto a sus capacidades para unir y activar a uno u otro receptor (Esparís-Ogando *et al.*, 2016). En el primer grupo estarían incluidos el *epidermal growth factor* (EGF), el *transforming growth factor* (TGF- α) y la anfirregulina (AR), los cuales son capaces de unir y activar a homodímeros del EGFR y a heterodímeros de este con otros receptores de esta familia (Klapper *et al.*,

2000; Roskoski, 2014). En el segundo grupo incluiríamos a las neuroregulinas (NRG), las cuales se unen a homodímeros de HER3 o de HER4 y a heterodímeros de estos con otros receptores de la familia (Tzahar *et al.*, 1994). En el tercer grupo estarían la betacelulina (BTC), la epirregulina (EPR) y el *heparin binding epidermal growth factor-like* (HB-EGF), que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de HER4 (Jones *et al.*, 1999), que carece de ligando directo conocido, aunque es activado por EGF, TGF- α , BTC o NRG cuando se heterodimeriza con el EGFR o HER4 como a heterodímeros de cada uno de ellos con otros miembros de la familia. El HER2 es, como hemos descrito anteriormente, un receptor huérfano.

Fisiológicamente, el HER1 se expresa principalmente en las células de la capa basal de la epidermis (Holbro and Hynes, 2004). La HER2 se expresa normalmente en las células de la capa basal epidérmica y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Kiguchi *et al.*, 2000). Además, la HER3 parece que se expresa en todas las capas de la epidermis humana y murina, aunque fundamentalmente en la capa suprabasal (Forsberg and Rollman, 2010). La HER4 no se expresa normalmente en la epidermis.

Algunos estudios han evidenciado que el EGFR podría tener un papel importante en el ensamblaje y desensamblaje de los desmosomas y las uniones adherentes (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. También, se ha detectado una ausencia de acantólisis en cultivos de queratinocitos al administrar IgG-PV junto a inhibidores del EGFR (Frusic-Zlotkin *et al.*, 2006; Chernyavsky *et al.*, 2007b). Nuestro grupo de trabajo también publicó que la administración de IgG-PV en ratones produce una activación de las distintas isoformas de HER (EGFR, HER2, HER3) y que su inhibición con erlotinib (inhibidor de EGFR, HER2, HER3), anula por completo la enfermedad (Pretel *et al.*, 2009).

La implicación de estos receptores y de sus ligandos en muchas enfermedades tumorales y autoinmunes ha permitido la utilización de fármacos inhibidores de cada uno de ellos (Roskoski R, 2014). Algunos ejemplos son los inhibidores de la TK dependiente de cada uno de ellos (desde el empleo inicial del gefitinib y del erlotinib, a la utilización más reciente del osimertinib) o de sus ligandos (como cetuximab como inhibidor de EGF) (Zhang, Zhou and Wu, 2019; Wilson *et al.*, 2012).

· Familia ADAM

Las proteinasas ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) son una fascinante familia de proteínas transmembrana con funciones importantes en la regulación del fenotipo celular a través de sus efectos sobre la adhesión celular, la migración, la proteólisis y la señalización (Edwards, Handsley and Pennington, 2009). Al ser metaloproteasas, dependen de un ion metálico coordinado (Zn^{2+}) para su mecanismo catalítico. Aunque todas las proteínas ADAM contienen dominios de metaloproteasas, en humanos solo 13 de los 21 genes de la familia codifican proteasas funcionales (véase **Fig. 8**).

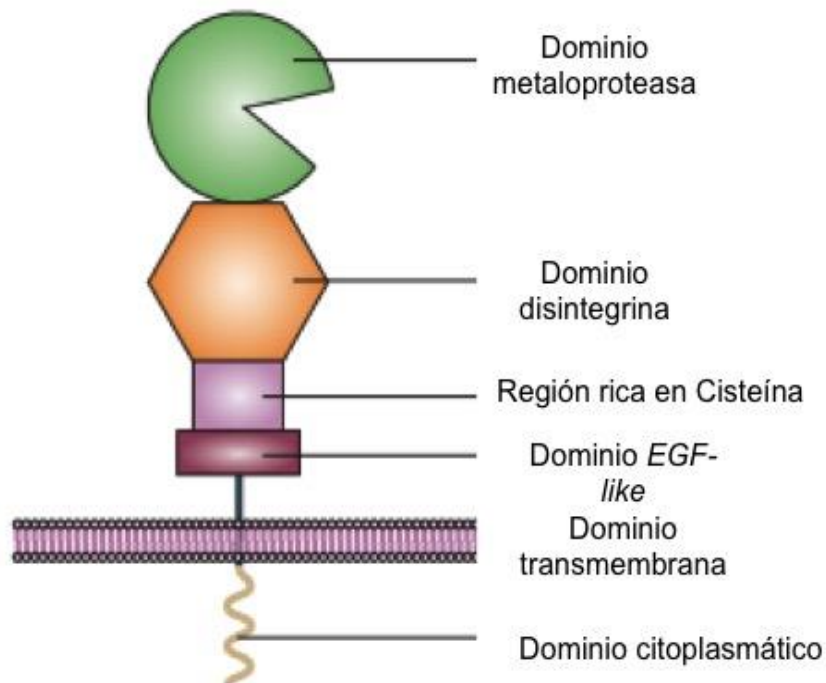


Figura 8. Organización del dominio de las ADAM (Modificado de Blobel, 2005).

Una de las funciones más interesantes y mejor caracterizadas de las ADAM catalíticamente activas es su papel en el desprendimiento de ectodominio de proteínas: la liberación proteolítica del ectodominio de una proteína de membrana que generalmente se desencadena por un corte adyacente a la membrana plasmática (Le Gall *et al.*, 2009). *Sheddase* es el nombre genérico que se da a estas proteínas por su capacidad de escindir las proteínas de membrana de la superficie celular, liberando ectodominios solubles con una ubicación y función alteradas (Solanas *et al.*, 2011) (véase **Fig. 9**).

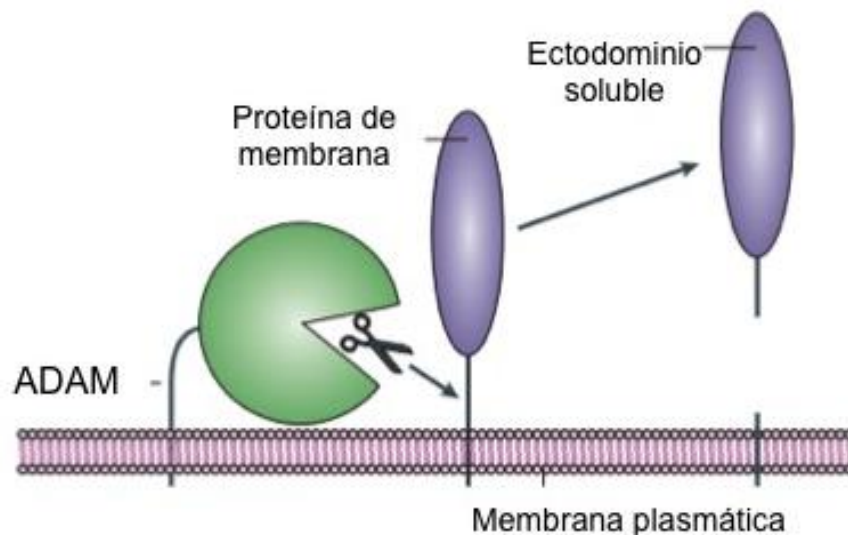


Figura 9: Representación esquemática de la actividad de la proteína ADAM con la escisión proximal a la membrana de una proteína de membrana, lo que da como resultado la liberación de su ectodominio soluble (Modificado de Blobel, 2005).

La liberación del ectodominio afecta a muchas moléculas estructural y funcionalmente diversas, como la citoquina proinflamatoria TNF α , todos los ligandos del receptor EGFR, receptores como el receptor I y II del TNF, ErbB2, ErbB4 y otras proteínas como Delta, la proteína precursora del amiloide y la L-selectina.

La ADAM10, actúa como protagonista en la señalización a través de las vías Notch y Eph/ephrin. Diferentes estudios demuestran que la ADAM10 es la principal *shedase* de EGF y betacelulina en fibroblastos embrionarios de ratón (Sahin *et al.*, 2004).

En combinación con dosis bajas de trastuzumab (Ac monoclonal capaz de unirse de forma selectiva al receptor HER2), los inhibidores selectivos de ADAM10 disminuyen la proliferación en líneas celulares que sobreexpresan HER2, mientras que los inhibidores ADAM, que no inhiben ADAM10, no tienen ningún impacto. Estos resultados son consistentes con que ADAM10 es un determinante principal de la liberación del ectodominio de HER2, cuya inhibición puede proporcionar un enfoque terapéutico para tratar el cáncer de mama y una variedad de otros cánceres con señalización activa de HER2 (Liu *et al.*, 2006).

Los estudios resultantes con ratones *knockout* para ADAM10 también han revelado un papel crítico de esta metaloproteasa en el desarrollo de linfocitos dependientes

de Notch. Además, estudios *in vitro* y *ex vivo* indican que la ADAM10 parece regular la producción de múltiples factores secretados que contribuyen a las reacciones autoinmunes (Gibb *et al.*, 2011).

Otro miembro importante de esta familia es la ADAM 17 (factor de necrosis tumoral-convertasa o TACE), que es la principal proteasa implicada en la activación de pro-TNF- α (Rose-John, 2013). En particular, se requiere de ADAM17 para la generación de las formas activas de los ligandos del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (Merchant *et al.*, 2008), y su función es esencial para el desarrollo de los tejidos epiteliales. La ADAM17 es la principal *shedase* de HB-EGF, TGF α , anfiregulina y epirregulina en diferentes tipos celulares (Sahin *et al.*, 2004).

Otros estudios muestran la activación de estas metaloproteasas y la consiguiente liberación de ligandos de EGFR a través la Src (Maretzky *et al.*, 2011).

La acción multiforme de la familia ADAM, y en concreto de la ADA10 y ADAM17, se ha implicado recientemente en la regulación de varios receptores de membrana de células del sistema inmune (Lambrecht, Vanderkerken and Hammad, 2018).

Se desconoce si esta familia de metaloproteasas juega un papel relevante en enfermedades como el PV. Sin embargo, su presencia en algunas uniones intercelulares (Wild-Bode *et al.*, 2006; Grabowska, Sandhu and Day, 2012) y un papel determinante en algunas enfermedades inflamatorias que ocasionan ampollas en la epidermis (Maretzky *et al.*, 2008), sugiere un papel en esta enfermedad.

· Otras vías de señalización

-Src

Inicialmente fue identificada como producto del gen transformante en el genoma del sarcoma de Rous en los pollos. Se trata de una proteína TK no dependiente de receptor que juega un papel fundamental en la señalización celular. La Src está implicada en el control de múltiples funciones incluyendo la adhesión, crecimiento, movimiento y diferenciación celular (Frame, 2002). Esta TK es una molécula de señalización *downstream* de numerosos receptores de factores de crecimiento incluido el EGFR (Thomas and Brugge, 1997) y conduce señales al núcleo, citoesqueleto y a 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 and Parsons, 2004).

Al igual que con otras proteínas quinasas, algunos trabajos han mostrado la implicación de la Src en patologías que cursan con inflamación (Paul *et al.*, 2001; Baruzzi *et al.*, 2008). Se ha observado también, un incremento de actividad de la Src en múltiples neoplasias, incluyendo varios tumores cutáneos (Serrels *et al.*, 2009) por lo que se ha convertido en una importante diana terapéutica en la batalla contra el cáncer (Benati and Baldari, 2008).

Algunos estudios han implicado a la Src 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.*, 2007b). Nuestro grupo de trabajo publicó que la inhibición de esta quinasa anula la enfermedad en un modelo murino (Sánchez-Carpintero *et al.*, 2004).

Por otro lado, no todos los trabajos publicados son igualmente concluyentes. En estudios realizados en cultivos de queratinocitos se observó que el receptor HER1 en la superficie celular, no se fosforiló en los residuos Y845 (lugar donde la quinasa Src actúa en este receptor) ni se inhibió la acantólisis celular cuando al cultivo se le añadió un 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 fosforilando el EGFR, sino que son los receptores HER los que, al activarse, activarán a la Src (Pretel *et al.*, 2009).

Además, otro estudio ha 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 cadherinas clásicas como la E-cadherina 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, presentando un papel relevante en la acantólisis

suprabasal del PV (Pretel *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2012). Este sería un efecto mediado por los Ac anti-Dsg3 (Walter *et al.*, 2019; Walter *et al.*, 2017) y se produciría una acción directa de la Src sobre el EGFR (Walter *et al.*, 2019; Pretel *et al.*, 2009) pero también del EGFR sobre esta quinasa (Gil *et al.*, 2012).

-FAK

A la FAK también se la conoce como PTK2 (proteína TK2) y es una TK soluble de 125-kDa y un sustrato para la Src (Essayem *et al.*, 2006).

La adhesión celular mediada por integrinas es el principal *upstream* activador de la FAK. 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. Además, la FAK está implicada en la reorganización del citoesqueleto a través de 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 cadherinas y la actina del citoesqueleto (Quadri, 2012). Otra función de la FAK asociada a los complejos de integrinas es inducir señales mitógenas dependientes de la activación de MAPK (Berkowitz *et al.*, 2005).

Los primeros trabajos que se publicaron sobre la implicación de la FAK en el PV comprobaron una sobreexpresión de la FAK en células acantolíticas en lesiones de PV y de 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 punto de unión en la patogenia del PV entre los receptores de acetilcolina ($\alpha 9$ AchR) y la FAK. Chernyavsky y cols. demostraron 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 Dsg3 (Chernyavsky, *et al.*, 2007a). 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. Nuestro grupo demostró a través de un modelo murino de transferencia pasiva cómo tras la administración de IgG-PV tiene lugar un incremento de los niveles de FAK fosforilado en los residuos tirosina 397 y 925 en los queratinocitos de la membrana basal. Cuando los ratones fueron pretratados con un inhibidor de FAK, se abolió la acantólisis y, además, se detectó una

disminución del FAK fosforilado (Y397/925) tras la administración de inhibidores del EGFR, de la Src, de la mTOR y de pan-caspasas (Gil *et al.*, 2012).

Como se puede observar, la respuesta intracelular en los queratinocitos por los Ac Dsg y nDsg pone en marcha múltiples vías de señalización. Además de las ya comentadas, señalaremos las de la placoglobina, PERK y la de Rho. La primera actúa en la transducción de señales al núcleo (Klymkowsky *et al.*, 1999), facilitando la acantólisis por alteraciones en el citoesqueleto y en el ensamblaje de los desmosomas (Bierkamp *et al.*, 1999; Aoyama, Owada and Kitajima, 1999; Caldelari *et al.*, 2001; de Bruin *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2006; Spindler *et al.*, 2014). Hay otras vías de señalización implicadas en el PV como la PERK que en cultivos de queratinocitos han mostrado un papel en la acantólisis (Lanza *et al.*, 2011). Por último, se ha demostrado también que la activación de Rho GTPasas podría prevenir la formación de acantólisis inducida por IgG-PV (Waschke *et al.*, 2006). A su vez, la inhibición de p38MAPK evita la disminución de la actividad de Rho A (Spindler and Waschke, 2011), lo que indica que la activación de p38MAPK producida por IgG-PV es mediada, al menos en parte, por la inhibición de Rho A. Además, al demostrarse que la formación de las uniones adherentes son necesarias para una correcta adhesión y desunión en los desmosomas, la pérdida de adhesión de los desmosomas en el PV puede ser debida, al menos en parte, a la inhibición de las uniones adherentes por la Rho A (Sajda and Sinha, 2018).

Un trabajo demostró que en la piel de enfermos con PV existe un aumento de la expresión de la isoenzima iNOS (NOS inducible) así como niveles elevados de óxido nítrico plasmáticos (Siebra *et al.*, 2006). Posteriormente nuestro grupo de trabajo demostró que, en el modelo murino de PV, los queratinocitos acantolíticos de la piel de los ratones presentan una expresión aumentada de iNOS, eNOS, nNOS y de residuos de nitrotirosina. Además, 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 IgG-PV (Marquina *et al.*, 2008).

1.2.3.6. Cambios en el citoesqueleto

Los primeros trabajos referentes a los hallazgos que se producen tras la unión del Ac del PV a los queratinocitos, describieron cambios en el citoesqueleto con la retracción de los tonofilamentos (Kitajima *et al.*, 1986) y la rotura de los

desmosomas llevando al encogimiento de las células basales (Hu *et al.*, 1978). Sin embargo, otras publicaciones posteriores mostraron que la rotura de los tonofilamentos y el aumento del espacio intercelular (véase **Fig. 10**) 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).

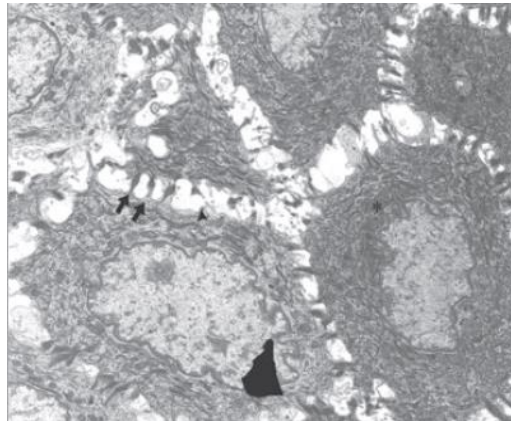


Figura 10. Piel de un paciente con PV clínicamente normal, pero con acantólisis tras ser valorada con microscopio electrónico de barrido. Se aprecia el ensanchamiento del cemento intercelular con los desmosomas estirados, pero todavía unidos (*flechas*). Además, se puede ver la rotura de los desmosomas detrás de la placa de inserción (*punta de flecha*). Véase la condensación de tonofilamentos (*asterisco*). Aumento original x 4800. Imagen modificada de (Diercks, Pas and Jonkman, 2009).

Existe una conexión entre los FIn de queratina (tipo I y tipo II), los de actina y las proteínas constitutivas de las uniones de anclaje (véase **Fig. 11**). Tras la unión de Ac a estas proteínas, se produce una desestructuración y alteración de su función; se rompe el equilibrio entre las enzimas con actividad quinasas y fosfatasa localizadas en las uniones intercelulares, fosforilando residuos serina/treonina o tirosina.

Varias de las quinasas anteriormente comentadas (Src, FAK, PKC), con un papel activo en el proceso de la acantólisis suprabasal en el PV, pueden también tener una acción importante sobre el citoesqueleto del queratinocito, y en concreto sobre las fibras de actina. Estas fibras forman parte de las uniones adherentes y de las uniones focales, por lo que también estas quinasas, al activarse, podrían controlar la adhesión intercelular, y contribuir a que los queratinocitos se separen en el PV (Spinardi and Marchisio, 2006; Li, Mruk and Cheng, 2013; Brownlow *et al.*, 2014)

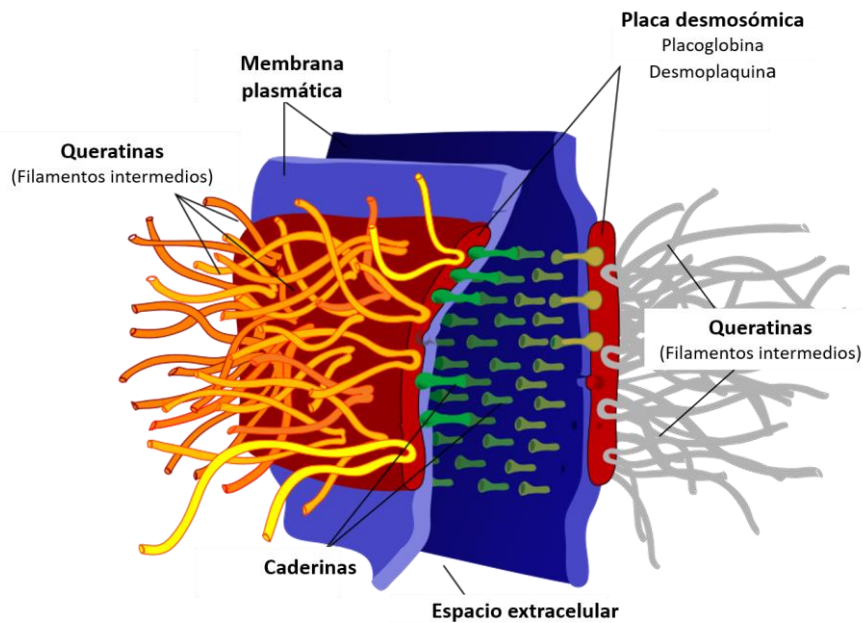


Figura 11. Esquema de la conexión entre los FI y la placa desmosómica

Los cambios que se producen en el citoesqueleto tras la activación de los mecanismos enzimáticos apoyarían la hipótesis del encogimiento de las células basales (Bystryn and Grando, 2006). Los autores de esta teoría postulan que la acantólisis sería el resultado de la retracción del citoesqueleto que provocaría un encogimiento celular. Los queratinocitos se separarían porque se encogerían más de lo que los desmosomas podrían soportar y no por un defecto primario en la función de los desmosomas. Este encogimiento estaría limitado a las células basales en el PV porque 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 a que, si la acantólisis fuese debida a alteraciones en las propiedades adhesivas de las desmogleínas 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; Dierckst *et al.*, 2009).

1.2.3.7. Apoptosis

Los trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y neoplásicas. 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.

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.

Las caspasas, también llamadas cisteína aspartato-proteasas específicas, son una familia de proteínas intracelulares implicadas en la iniciación y ejecución de la apoptosis (Nicholson and Thornberry, 1997).

Hasta la fecha, se han identificado 3 rutas principales que activan la apoptosis asociada a la activación de caspasas en mamíferos (Creagh *et al.*, 2003). Las tres vías identificadas son la vía extrínseca o del Fas, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía dependiente de granzima-B. Independientemente de la vía de activación de las caspasas, todas las vías conducen a la activación de las principales caspasas efectoras, la caspasa 3, 6 y 7 (véase **Fig. 12**). En los poros de la mitocondria están las proteínas reguladoras BAX/Bcl-2. Cuando el índice de éstas se altera, el citocromo C se une a APAF1 y a la caspasa 9 formándose el apoptosoma que activa a la caspasa 3.

La activación de caspasas está implicada en aspectos diferentes de la apoptosis como son la fragmentación nuclear 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 e Y catenina, Dsc, Dsg1 y Dsg3 desmoplaquina, E cadherina (Kitazumi and Tsukahara, 2011), FAK (Mian *et al.*, 2008), MEKK1 y p38 (Berkowitz *et al.*, 2005).

Se piensa que la apoptosis juega un papel en la muerte de queratinocitos en el PV (Lotti, Marconi and Pincelli, 2012), aunque no han faltado estudios aislados que no lo confirman (Janse *et al.*, 2014). 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 pro-apoptóticas como Fas, FasL, Bax, p53 y disminución de marcadores anti-apoptóticos como Bcl-2 y FLIP (Gniadecki *et al.*, 1998; Lotti *et al.*, 2018). En especial, esta inducción de los mecanismos de apoptosis se debería a la activación de p38MAPK (Mavropoulos *et al.*, 2013). Además, la IgG-PV de los pacientes con PV induce marcadores moleculares de apoptosis en queratinocitos en monocapa y cultivos celulares (Pelacho *et al.*, 2004). La activación de las caspasas -1, -3 y -8 ha sido observada después de administrar IgG-PV a queratinocitos en cultivo y el pretratamiento con inhibidores de caspasas bloquea la acantólisis (Arredondo *et al.*, 2005). Este aumento de los niveles de caspasas, especialmente de caspasa-3, sería un acontecimiento precoz en el proceso de acantólisis (Luyet *et al.*, 2015). Resultados similares a los observados se han demostrado también en biopsias de pacientes con PV (Cuevas-Gonzalez *et al.*, 2016; Sanath *et al.*, 2018). Todos estos hallazgos podrían inducirse gracias al daño producido por IgG-PV sobre las mitocondrias (Kalantari-Dehaghi, Chen, *et al.*, 2013), y en concreto mediante la acción de los Ac anti-mitocondriales presentes en el suero de los pacientes (Chernyavsky *et al.*, 2015). Nuestro grupo también encontró que en el PV, nNOS puede aumentar las actividades de caspasa-9 y caspasa-3. Estos hallazgos subrayan la conexión entre caspasas, nNOS, Src, mTOR y FAK quinasa en la acantólisis y apoptosis en el PV (España *et al.*, 2013).

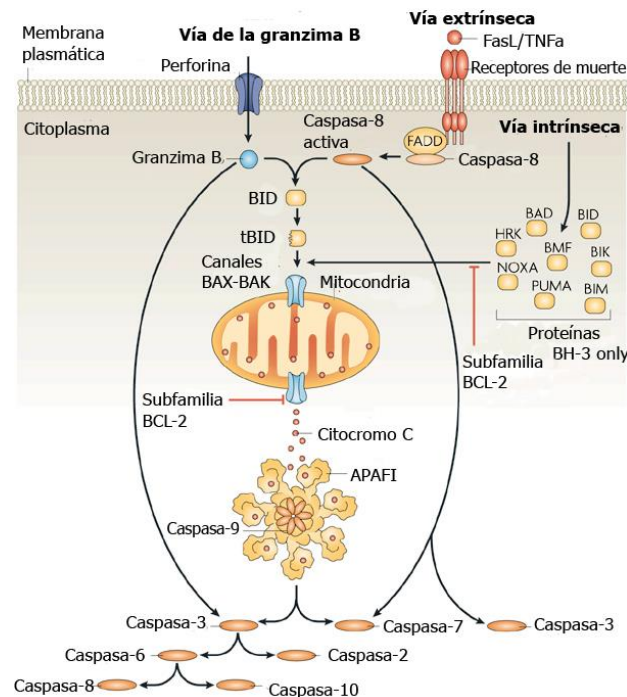


Figura 12: Esquema de las vías de activación de las caspasa (Taylor, Cullen and Martin, 2008).

1.2.4 Teorías etiopatogénicas postuladas en el pénfigo vulgar

Para aclarar la etiopatogenia en el PV a lo largo de los años se han ido proponiendo varias teorías. Cada una de ellas aporta una parte al conjunto del proceso de acantólisis, sin que ninguna de ellas agote toda la verdad.

1.2.4.1. Teoría compensatoria (*Desmoglein Compensation Theory*) (Mahoney *et al.*, 1999).

Se fundamenta en la diferente expresión de la Dsg1 y Dsg3 en la piel y en las mucosas para así explicar el nivel de acantólisis en la epidermis en el PV (Mahoney *et al.*, 1999.) En la epidermis de la piel del ser humano y ratón la Dsg3 se localiza principalmente en las capas más profundas, al contrario que la Dsg1, que se encuentra en los estratos más superficiales. Por lo tanto, para que se produzcan ampollas en la piel es necesario que existan Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3. En mucosas, la Dsg3 se expresa en todos los estratos, mientras que la Dsg1 está casi ausente en las capas más profundas. Por lo tanto, en mucosas se producen ampollas cuando hay anti- Dsg3 circulantes. Según este modelo, las ampollas en pacientes con PF ocurren en un nivel epidérmico subcórneo porque la Dsg3 presente en estratos profundos compensa la pérdida de Dsg1 producida por los Ac anti-Dsg1. En el PV, las lesiones en la piel ocurren solamente cuando existen Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3 porque la Dsg1 está presente en todas las capas epidérmicas y compensa la pérdida de Dsg3 cuando solo existen Ac anti-Dsg3 (véase **Fig. 13**).

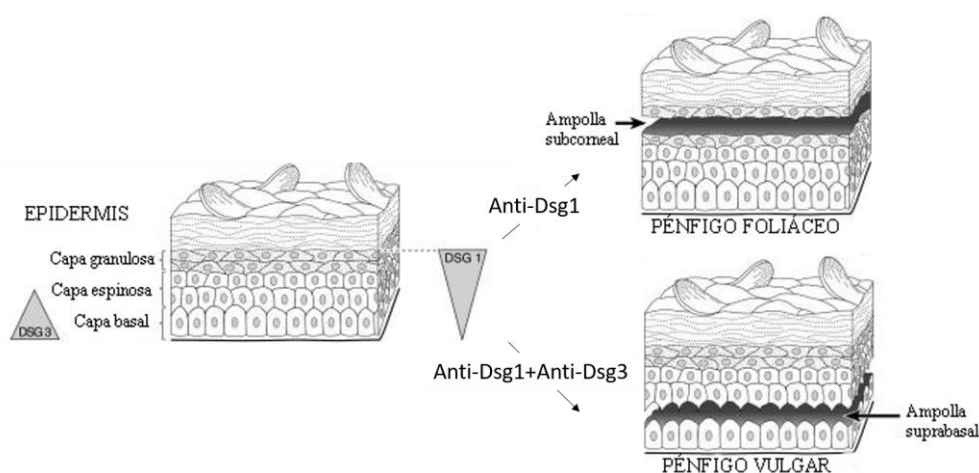


Figura 13: Esquema de la teoría compensatoria de las desmogleínas en el PV y PF. Esta teoría no da respuesta a algunos hallazgos que se observan en el PV. No está claro por qué el plano de rotura se restringe a la región suprabasal en el PV cutáneo-

mucoso (con Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3) y los Ac anti-Dsg1 no causan separación en la capa granulosa, ya que en el PF los Ac anti-Dsg1 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 Dsg3 no presentan lesiones ampollosas espontáneas (Koch *et al.*, 1997). Otro punto sin resolver de la teoría compensatoria sería el de por qué algunas personas que tienen anti-Dsg1 y/o anti-Dsg3 no desarrollan PV. Entre un 40% y un 71 % de los familiares de primer grado de los pacientes con PV presentan títulos bajos de 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 una enfermedad ampollosa- presentan también Ac anti-Dsg. Por último, la inactivación del gen de la Dsg3 o la depleción de la Dsg3 de los queratinocitos de la epidermis de animales de experimentación o de cultivos monocapa no inducen ampollas cutáneas o rotura de los desmosomas, respectivamente. Así pues, hoy por hoy la teoría compensatoria no puede explicar todos los hallazgos clínicos, histológicos, inmunológicos y moleculares que pueden encontrarse en el PV.

1.2.4.2 Teoría de la disrupción física (*Steric Hindrance Theory*) (Shimizu *et al.*, 2004)

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

El hallazgo de la integridad de los desmosomas hasta fases finales de la acantólisis (Bystryn and Grando, 2006), 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 (Caldelari *et al.*, 2001) y la observación de que la inhibición de algunas vías de señalización intracelular anula la acantólisis (Sánchez-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 Dsg1 (Waschke *et al.*, 2005).

1.2.4.3. Teoría sobre la inducción de la apoptosis a través de los Ac

Se ha hipotetizado que la apoptosis puede ser el mecanismo que conduce a la acantólisis (Wang *et al.*, 2004; Puviani *et al.*, 2003) basándose en que la IgG-PV y los Ac anti-FasR elevan los niveles intracelulares de FasL y FasR, Bax y p53 con la consiguiente activación de caspasas. Además, la IgG-PV al unirse al EGFR activaría de forma directa las caspasas. Pero también se ha planteado que la apoptosis, como fragmentación nuclear, puede no ser necesaria para la acantólisis (Schmidt *et al.*, 2009; Schmidt and Waschke, 2009). En cualquier caso, el PV sería consecuencia de la disminución de la adhesión celular y de la apoptosis. Ambos hechos ocurrirían en asociación con la separación intercelular y pueden estar desencadenados por IgG-PV (Pan *et al.*, 2011).

1.2.4.4. Teoría del “encogimiento de las células basales” (Bystryn and Grando, 2006)

Como ya hemos referido Bystryn y cols. (2006) postulan que la acantólisis sería resultado de la retracción del citoesqueleto que provocaría un encogimiento celular. Este hecho estaría limitado a las células basales en el PV porque éstas se encogerían más que las células suprabasales tras el contacto con los Ac. Los autores comentan que, si la acantólisis fuese debida a alteraciones en las propiedades adhesivas de las Dsg, ésta 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 en las células suprabasales (Ndoye *et al.*, 1998). Además, en las células basales existen distintos tipos de queratinas que en las suprabasales. Las células basales expresan K5 y K14, mientras que las suprabasales expresan K1 y K10. Ya que las queratinas están implicadas en el mantenimiento de la forma celular, el impacto de la unión de los Ac del PV en la estructura y/o rigidez del citoesqueleto podría ser distinto en ambas células y podría explicar por qué el encogimiento celular se limita a las células basales.

1.2.4.5. Teoría de la apoptolisis (Grando *et al.*, 2009)

En el año 2009, Grando y cols. proponen el término de apoptolisis tratando de unir la acantólisis suprabasal y componentes apoptóticos como implicados en el encogimiento celular. La diferencia fundamental entre apoptosis y apoptolisis, es que este último concepto implica que las células basales se encogen, pero no mueren (véase **Fig. 14**). La acantólisis y cambios en componentes apoptóticos son hechos inseparables en el 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 bloquean 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, 2010; Pretel *et al.*, 2009)

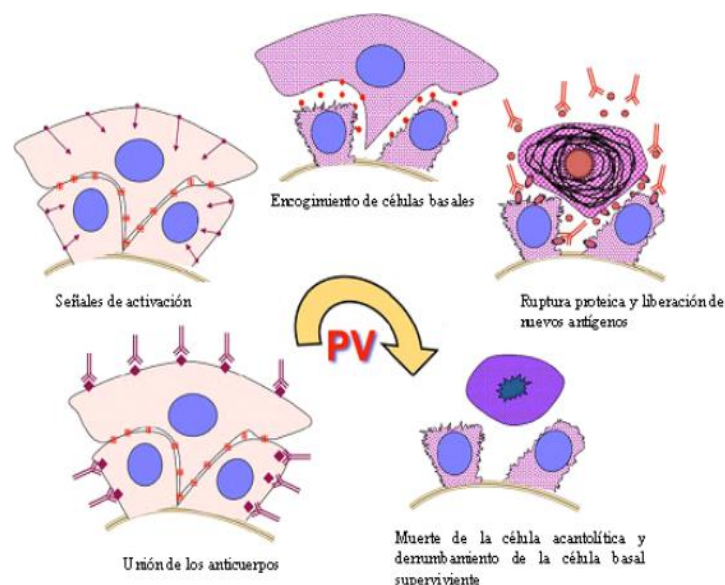


Figura 14. Esquema que muestra la teoría de la apoptolisis (modificado de Grando *et al.*, 2009).

1.2.4.6. Teoría de las múltiples vías patogénicas de señalización (*multiple hit theory*) o teoría multipatogénica (Nguyen *et al.*, 2000)

La teoría del *multiple hit* establece que es necesaria una inactivación simultánea y sincronizada de los mecanismos fisiológicos que regulan y/o median la adhesión intercelular de los queratinocitos para alterar la integridad epidérmica durante la acantólisis. La principal premisa para esta teoría es que un único tipo de Ac induce sólo cambios reversibles, de modo que los queratinocitos afectados pueden recuperarse debido a una autoreparación. El daño, sin embargo, se vuelve irreversible cuando la vía de rescate y/u otras funciones celulares se alteran por un Ac asociado a otros factores patógenos. Esta teoría defiende el hecho de que el suero de los pacientes con PV reconoce distintos Ag y que la Dsg3 sería sólo uno de ellos. Por ejemplo, si se bloquea la Dsc3 con Ac específicos se forman ampollas intraepidérmicas (Spindler *et al.*, 2009; Aoyama, Nagai and Kitajima, 2010). Cada Ag contribuiría de forma coordinada a la acantólisis por una única vía de señalización intracelular, que se complementarían y actuarían sinérgicamente con las demás a la pérdida de adhesión y formación de ampollas.

En los últimos años todos estos conceptos se han resumidos en dos grandes teorías. Algunos autores han intentado aglutinar los datos expuestos en la *teoría monogénica*, explicando la patogenia del PV por la única presencia de los Ac anti-Dsg. Y quizá, basándose en los argumentos comentados hasta ahora, otros autores comparten la *teoría multipatogénica* (o *multiple hit theory*) afirmando que ambos Ac, los Dsg y nDsg son necesarios y complementarios para inducir la acantólisis suprabasal en el PV (Amagai, Klaus-Kovtun and Stanley, 1991; Ahmed *et al.*, 2016; Grando *et al.*, 2009; Kalantari-Dehaghi, Anhalt, *et al.*, 2013; Walter *et al.*, 2017; Chernyavsky *et al.*, 2007b).

1.2.5. Manifestaciones clínicas

Entre las manifestaciones clínicas del PV, es característica la aparición de ampollas flácidas en la mucosa oral, casi siempre inicialmente en orofaringe, que posteriormente se extienden a otras localizaciones de la cavidad oral, como encías, úvula, lengua, labios y pilares amigdalinos (véase **Fig. 15**). Estas lesiones suelen ser dolorosas y por lo general no curan espontáneamente. Se piensa que la cavidad oral

está afectada hasta en el 94% de los casos. El dolor que producen estas lesiones puede ser muy intenso e interferir con la alimentación del paciente.

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



Figuras 15A y B. Lesiones ampollosas palpebrales y conjuntivitis en un paciente con PV (A). Afectación del bermellón del labio en otro paciente con PV (B)

En una publicación realizada 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 (España *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2012; España and Fernandez, 2017). En todos los casos los síntomas aparecían o empeoraban coincidiendo con los brotes de la enfermedad y mejoraban con la optimización del tratamiento. A todos los pacientes se les realizó una fibroendoscopia y se observó que en varios de ellos existía afectación nasal y laríngea sin sintomatología clínica. El 62% de los casos presentaban afectación de la mucosa nasal, aunque únicamente tenían síntomas (epistaxis, costras nasales) el 38%. Además, el 75% de los pacientes tenían lesiones activas en la laringe (100% de los casos de PV predominantemente mucoso), de los cuales solo el 44% presentaban síntomas como la disfonía o ronquera. En cuanto a la afectación faríngea, el 62% de los casos presentó afectación de la faringe, todos con síntomas de odinofagia. La afectación del conducto auditivo externo se encontró en el 19% de los pacientes y presentaban síntomas como dolor y obstrucción del canal auditivo. (España *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2012; España and Fernández, 2017). No se sabe exactamente la frecuencia de afectación del PV en otras superficies mucosas.

Un estudio de los últimos años demuestra que no es infrecuente la afectación de la mucosa anal (Khezri *et al.*, 2013). Se manifiesta con rectorragias, dolor, mal olor por sobreinfección y adhesión de la ropa interior a las lesiones. Esta afectación puede ser muy limitante e incluso se han publicado casos de muerte por sangrado rectal masivo (Ashworth *et al.*, 1987). La frecuencia de afectación del tracto genital femenino por el PV es desconocida. Un estudio del 2008 mostró que esta afectación no es tan infrecuente como se había descrito y de una serie con 77 pacientes señalan que hasta el 51% de sus pacientes tenían afectación genital en algún grado, siendo la segunda localización más afectada después de la mucosa oral (Akhyani *et al.*, 2008). Puede afectarse el cérvix, vagina y la vulva siendo la afectación del cérvix excepcional, con muy pocos casos publicados. La clínica que presentan estas pacientes es de dolor o quemazón al orinar, dispareunia y mal olor (Malik and Ahmed, 2005; Fairbanks Barbosa *et al.*, 2012). La afectación del tracto genital masculino es poco frecuente y suele ocurrir en formas cutáneo-mucosas severas. Las lesiones se suelen localizar en forma de erosiones en el surco balanoprepucial y/ o parte proximal del glande, pudiendo constituir el primer signo de la enfermedad (Sami and Ahmed, 2001; Stieger *et al.*, 2013). En pacientes con PV, la afectación ocular es una excepción. El PV con afectación ocular se asocia con una mayor actividad de la enfermedad, y generalmente sigue un curso benigno. Las localizaciones más frecuentes en la afectación ocular son la conjuntiva, los párpados o ambos (España *et al.*, 2017) en forma de conjuntivitis y blefaritis (véase **Fig. 15**). Solo en una minoría de los casos se observan ampollas o erosiones de la conjuntiva bulbar/palpebral o en el margen palpebral próximo al lacrimal. Aunque es infrecuente, también pueden verse lesiones en región periungueal en forma de paroniquia, onicomadesis y traquioniquia (Carducci *et al.*, 2008) (véase **Fig. 16**).

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 Ns, 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 progresivamente se vuelven flácidas (cfr. **Fig. 16**). A veces pueden ser mayores y confluentes afectando grandes superficies de piel. Las localizaciones más frecuentes son el cuero cabelludo, cuello, flexuras y línea media de espalda (Joly and Litrowski, 2011) porque en estos sitios existe una mayor

cantidad de desmogleínas. El techo de la ampolla suele romperse con facilidad y normalmente las lesiones se observan en forma de erosiones o costras. Cuando las lesiones curan, normalmente tras el tratamiento, no suelen dejar cicatrices residuales, pero si una hiperpigmentación post-inflamatoria.



Figuras 16A y B. Lesiones cutáneas periungueales en un paciente con PV (A). Ampollas flácidas con Ns positivo en espalda dorsal en otro paciente con PV (B).

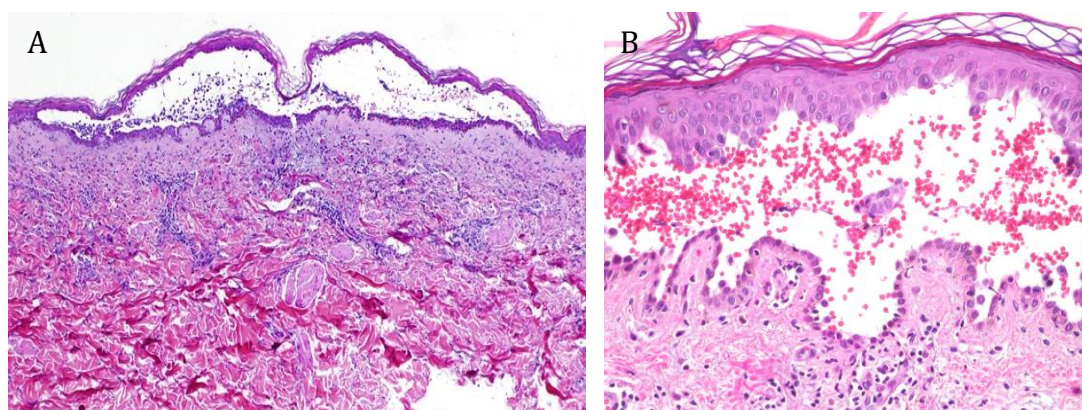
1.2.6. Diagnóstico

El diagnóstico del PV requiere la presencia de las lesiones cutáneas y/o mucosas características. Ante un paciente con clínica sospechosa, deberá también realizarse una biopsia cutánea con técnicas de IFD. También deberán investigarse la presencia de Ac circulantes frente a la sustancia intercelular epidérmica (SIE) mediante IFI, y se si dispone de ello buscar si los pacientes presentan Ac circulantes frente a la Dsg1 y 3 mediante técnica de ELISA. Sólo si tenemos alguna duda diagnóstica realizaremos técnicas de *immunoblot* o inmunoprecipitación.

1.2.6.1. Histopatología

La acantólisis suprabasal es el dato más característico en el estudio histopatológico. Se manifiesta como una hendidura o separación entre la capa basal y el resto de la epidermis. La preservación de la capa basal, localizada en el suelo de la ampolla formada, es una condición fundamental para el diagnóstico histológico de PV. No es

característica la presencia de un infiltrado inflamatorio, aunque en ocasiones se observa un infiltrado eosinofílico antes de la aparición de la ampolla. Además, en el interior de la hendidura, pueden observarse células redondeadas llamadas “células acantolíticas”, que no son más que los queratinocitos que han perdido su adhesión con el resto (véase **Figs. 17A-B**).



Figuras 17A y B. Ampolla intraepidérmica (A) con acantólisis suprabasal, y algunas células inflamatorias junto a abundantes hematíes en el interior de la hendidura epidérmica (hematoxilina-eosina) (B).

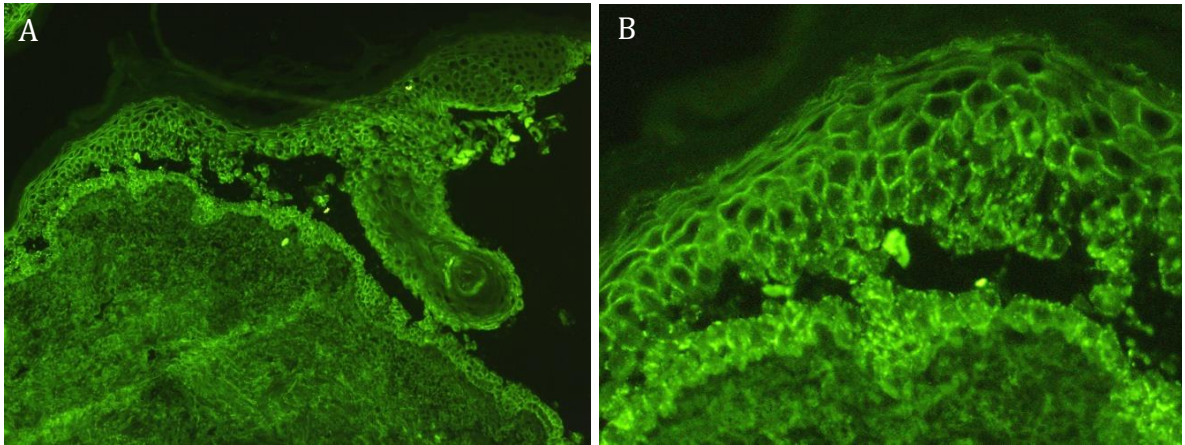
1.2.6.2. Inmunofluorescencia directa e indirecta

La IFI detecta los Ac 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. El título de estos Ac en el suero de los pacientes se correlaciona con la actividad y extensión de la enfermedad (Bhol *et al.*, 1994). No obstante, esta técnica tiene varios inconvenientes. En concreto, no permite determinar frente a que estructuras se unen los Ac y detecta también Ac no patogénicos contra Ag 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 las 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. Esta prueba 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 Ag 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 depósitos de IgG y C3 alrededor de los queratinocitos en las lesiones cutáneas de PV (véase **Figs. 18 A-B**). Para la IFD es necesario tomar una biopsia de piel perilesional (a más de 1 cm de la ampolla). Esta muestra debe ser congelada inmediatamente y guardada a -70°C . Se detectan depósitos de inmunorreactantes en el espacio intercelular de los queratinocitos. Normalmente se suelen observar depósitos de IgG y complemento (C3) con el mismo patrón. El depósito de IgG granular que se detecta con cierta frecuencia no refleja la distribución normal de la Dsg; se hipotetiza que la IgG induce la formación de racimos de autoAg de Dsg procedentes de la Dsg disminuida en 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. La IFD tiene un valor predictivo positivo que ronda el 100% (Mutasim and Adams, 2001).



Figuras 18A y B. Imágenes de IFD del PV. Se observan depósitos pericelulares de IgG en los queratinocitos en los dos tercios inferiores de la epidermis (A). Imagen a mayor aumento (B).

1.2.6.3. Immunoblot e inmunoprecipitación

Con la introducción del *immunoblot* ha sido posible distinguir los distintos tipos de Ac circulantes y, por lo tanto, diferenciar el PV del PF. Mediante el empleo de Ag de extractos de hocico bovino o epidermis humana, se detecta el Ag 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 Ac que reaccionan frente a epítomos desnaturalizados o secuenciales. Esto es debido a que durante el proceso de análisis se produce una desnaturalización de los Ag. Mediante esta técnica normalmente se detecta una banda de 130-kDa (Dsg3), y con menor frecuencia, otra de 160-kDa (Dsg1). Además, se puede detectar una banda de 85-kDa, común al PV y PF y que se corresponde con la PG (Eyre and Stanley, 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 (Dsg3) 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 es mayor que el *immunoblot* y necesita el uso de radioactividad.

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

1.2.6.4. ELISA

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

En el momento actual existen *kits* comerciales para distintas enfermedades ampollosas autoinmunes. En concreto, existe un *kit* comercial que detecta la presencia de Ac contra la Dsg1 y la Dsg3, basado en el uso de moléculas recombinantes de estas moléculas sintetizadas con el sistema del baculovirus, así como otros que detectan Ac frente a Dsg4. Estas determinaciones deben realizarse en fases de actividad de la enfermedad, ya que cuando los pacientes entran en remisión, negativizan primero los anti-Dsg3 y pacientes con PV podrían erróneamente diagnosticarse de PF por esta técnica (Ishii *et al.*, 1997).

1.2.7. 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 and Litrowski, 2011; Risser *et al.*, 2009). En un artículo reciente que incluye 184 pacientes se concluye que el pronóstico de estos pacientes está influenciado por la edad avanzada, la hipoalbuminemia, la diabetes mellitus y comorbilidades neurológicas y respiratorias en el momento del diagnóstico (Kridin *et al.*, 2018)

1.2.8. Tratamiento

En el tratamiento del paciente con PV además del tratamiento farmacológico es fundamental la prevención para evitar la aparición de nuevas lesiones, así como determinadas medidas higiénico-dietéticas (Kridin, 2018a). Deberán evitarse traumatismos locales para no provocar erosiones cutáneas, no emplear adhesivos cutáneos y manejar a los pacientes sin presionar la piel a la hora de atenderles. Se evitará también la ingesta de alimentos sólidos. Se recomendará al paciente el empleo de fotoprotectores para anular el posible papel inductor de lesiones a través

de la luz ultravioleta. Se estudiará la conveniencia de cirugías en fases activas del PV. En los casos en los que estas sean inaplazables, resulta preciso que los pacientes ingieran dietas hipercalóricas e hiperproteicas que favorezca la cicatrización de las lesiones. En pacientes con intensa afectación orofaríngea será necesario también la colocación de una sonda. Son varios los artículos que abordan la necesidad de un tratamiento integral (Kridin *et al.*, 2019; Didona *et al.*, 2019; Mays *et al.*, 2019; Bilgic Temel and Murrell, 2019; van Beek, Zillikens and Schmidt, 2019; Kridin, 2018a; Pollmann *et al.*, 2018; Tavakolpour, 2017; Atzmony *et al.*, 2015; Martin and Murrell, 2011).

El manejo terapéutico del PV (Hertl *et al.*, 2015) se centra en la inmunosupresión, que puede ser inespecífica con el uso de corticosteroides o agentes ahorradores de esteroides, o específica con el bloqueo terapéutico de la producción de autoAc, ciertas citocinas o vías de señalización. En la actualidad, la terapia de primera línea para el tratamiento del PV sigue siendo el corticosteroide sistémico, pero, aunque es muy efectivo, los efectos secundarios significativos de su uso a largo plazo están bien documentados. Las terapias adyuvantes tienen como objetivo eliminar, o al menos disminuir, la dosis necesaria de corticosteroides (Tavakolpour, 2017). Específicamente, la azatioprina, la ciclofosfamida, el metotrexato, la ciclosporina, el micofenolato mofetilo y la dapsona se usan ampliamente en el PV. Las inmunoglobulinas intravenosas, la plasmaféresis, la inmunoadsorción y, más recientemente, el rituximab, son otros elementos del arsenal terapéutico. Sin embargo, a pesar del amplio rango de opciones de tratamiento para esta rara enfermedad, faltan ensayos clínicos bien controlados y guías de consenso (Sinha, Hoffman and Janicke, 2015; Zhao and Murrell, 2015).

Antes de la introducción de los corticoides sistémicos, el PV tenía una mortalidad muy elevada. La mayoría de los pacientes morían 5 años después del diagnóstico, por complicaciones secundarias. La introducción de los corticoides sistémicos y los inmunosupresores han mejorado considerablemente el pronóstico del PV. 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 (Ahmed, 2013). El objetivo principal del tratamiento es reducir la respuesta inflamatoria y la producción de autoAc.

El beneficio de los corticosteroides sistémicos se fundamenta en su efecto antiinflamatorio, con una acción inhibitoria de vías intracelulares que intervienen en los mecanismos inflamatorios y la disminución en la síntesis de autoAc (Nguyen *et al.*, 2004).

Inicialmente, el objetivo de la terapia en el PV es controlar la enfermedad con la dosis mínima eficaz de corticosteroides. La vía de administración más usada es la oral y el fármaco preferido la prednisona. Los corticosteroides actúan relativamente rápido y si se utilizan a dosis apropiadas durante periodos de tiempo limitados son relativamente seguros. La mejoría clínica suele observarse a los pocos días del inicio del tratamiento, aunque las lesiones nuevas suelen dejar de aparecer a las 2-3 semanas y la curación completa suele ocurrir tras 6-8 semanas. La dosis única matutina suele más segura para tratamientos a largo plazo. La mayoría de los pacientes se controlan con una dosis de 1-2 mg/kg/día. Dosis superiores a 1 mg/kg/día no ofrecen terapéuticamente más ventajas y en cambio producen más efectos secundarios (Ratnam *et al.*, 1990). Si los pacientes no mejoran con esta dosis después de 1 mes de tratamiento, deberemos buscar otra alternativa terapéutica (Mutasim, 2004). Cuando se consigue una remisión clínica y ésta es continuada se debe intentar disminuir la dosis progresiva e idealmente se debe llegar a una dosis de mantenimiento de 5 mg/día. Una vez obtenida la remisión clínica de la enfermedad, los cambios en el título de Ac medidos mediante ELISA o IFI pueden ser útiles para adaptar la dosis de prednisona.

No hay que despreciar los efectos secundarios de los glucocorticoides. Dentro de los efectos inmediatos, se han descrito la retención de sales, el aumento del apetito y de peso, así como los trastornos neuropsiquiátricos (insomnio, irritabilidad, euforia, depresión, episodios maníacos, irritabilidad). A largo plazo suponen un mayor riesgo de infecciones, hábito *cushingoide*, diabetes, osteoporosis, osteonecrosis, miopatía, sangrado gastrointestinal, cataratas, adelgazamiento de la piel y toxicidad del sistema nervioso.

Se ha propuesto también la administración de corticosteroides por vía intravenosa en forma de bolus de metilprednisolona. No existen grandes series que permitan afirmar si hay suficiente evidencia científica para su empleo en los pacientes con PV (Mentink *et al.*, 2006). También es útil la administración tópica de corticosteroides

en lesiones aisladas (Dumas *et al.*, 1999). En otros casos, se podría usar dexametasona oral pulsada (300 mg/día durante 3 días) además de la prednisolona oral y la azatioprina (Mentink *et al.*, 2006).

Con respecto a los tratamientos sistémicos (Ahmed, 2013), la azatioprina y el micofenolato mofetilo se usan habitualmente en combinación con los esteroides y se consideran fármacos adyuvantes de primera línea (Hertl *et al.*, 2015) con el objetivo de aumentar la inmunosupresión, ahorrar corticosteroides y reducir el riesgo de recaída (Atzmony *et al.*, 2015). Son de efecto más lento que los corticosteroides y habitualmente se añaden cuando la enfermedad está ya controlada y es posible 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. Ha sido ampliamente utilizada con éxito en el PV como ahorrador de corticosteroides orales (Kakuta *et al.*, 2018; Benoit Corven *et al.*, 2003). Se utiliza a dosis de 2-4 mg/kg/día (normalmente 100-300 mg/día) y sus efectos adversos más frecuentes son las náuseas, pancitopenia, pancreatitis y hepatotoxicidad.

El micofenolato mofetilo se suele usar en el PV entre 1-3 gr/día. Estudios realizados con un número aceptable de pacientes han mostrado que el micofenolato mofetilo es un fármaco efectivo y seguro para su uso combinado con corticoides orales en el PV (Doukaki *et al.*, 2015; Mimouni *et al.*, 2003), con una eficacia ligeramente superior a la observada con la administración de azatioprina (Beissert *et al.*, 2006). Aunque es cuatro veces más caro que la azatioprina, su mayor tolerancia y seguridad le convierten en el fármaco de elección como ahorrador de corticoides.

La ciclofosfamida ha sido utilizada como agente ahorrador de corticoides en casos de PV muy severos y se piensa que es el fármaco inmunosupresor más eficaz en el PV. Es un fármaco alquilante que bloquea el crecimiento celular y la actividad mitótica. Se administra en dosis de 1-3 mg/kg/día. Los efectos secundarios son cistitis hemorrágica, esterilidad, alopecia, teratogenicidad, leucopenia y aumento del riesgo de neoplasias. Se ha observado que cuando se administra en forma de pulsos intravenosos cada 2 semanas o mensualmente la eficacia aumenta y sus efectos adversos disminuyen considerablemente (Fleischli *et al.*, 1999; España *et al.*, 2009).

La experiencia con ciclosporina es limitada. Las series de casos publicadas son con muy pocos pacientes. No obstante, hoy en día la opinión más extendida es que este fármaco no es de gran eficacia para el tratamiento del PV.

La plasmaféresis es útil para disminuir rápidamente el título de Ac circulantes, y 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). Además, su empleo será beneficioso también en aquellos casos en los que la actividad de la enfermedad es importante, con un título elevado de Ac circulantes. También, puede indicarse en aquellos pacientes en los que no podamos emplear fármacos inmunosupresores, como ocurre por ejemplo en mujeres embarazadas. La inmunosupresión concomitante con corticosteroides y ciclofosfamida previene un aumento de rebote post-plasmaféresis en la producción de autoAc.

Las inmunoglobulinas intravenosas a dosis altas han sido usadas con éxito en casos de PV refractarios (Jolles, 2001). Hoy en día se siguen indicando en pacientes muy seleccionados (Hoffmann and Enk, 2017) en especial en pacientes embarazadas (Tavakolpour, Mirsafaei and Delshad, 2017). Se ha demostrado que su administración permite reducir de forma significativa el título de Ac circulantes frente a la Dsg1 y Dsg3 del tipo IgG4 (Green and Bystryn, 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 Ac monoclonal quimérico humano-murino anti-CD20 (rituximab) comercializado con el nombre de MabThera®. El rituximab deplecciona transitoriamente los linfocitos B CD20-positivos de la circulación. Ha sido empleado en más de un millón de pacientes con linfoma no Hodgkin CD20-positivo y se han observado pocos efectos adversos graves. El rituximab se administra vía intravenosa a dosis de 375 mg/m² semanalmente durante 4 semanas. Según algunos estudios, 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 tras un solo ciclo de tratamiento en pacientes con PV (Vinay *et al.*, 2018; Murrell and

Sprecher, 2017; Sanchez *et al.*, 2018; España *et al.*, 2004). La administración de rituximab puede inducir remisión clínica a más largo plazo, coincidiendo un efecto más prolongado de depleción de células B, y de células T reguladoras de Dsg3. (Colliou *et al.*, 2013; Leshem *et al.*, 2014). Estos efectos terapéuticos hacen del rituximab un fármaco prometedor en el PV (Ahmed *et al.*, 2016). Más recientemente, se confirmó que rituximab en el PV podría ser un tratamiento de primera línea al producir un beneficio más precoz, más prolongado en el tiempo y con menos efectos secundarios que pacientes en una situación clínica similar tratados con corticosteroides sistémicos (Joly *et al.*, 2017). Aunque se han descrito casos aislados de leucoencefalopatía multifocal progresiva en pacientes tratados con este fármaco, su número tan reducido no permite todavía sacar conclusiones definitivas, y por otro lado, el análisis de todos los casos publicados muestra que es un fármaco eficaz y seguro (Tavakolpour *et al.*, 2018). El beneficio terapéutico de otros fármacos anti-CD20, como el veltuzumab, podría evitar estos efectos secundarios (Ellebrecht *et al.*, 2014).

Otros fármacos biológicos cuyos resultados habían sido reportados como eficaces en enfermedades ampollosas autoinmunes son los agentes anti-TNF; el etanercept (Enbrel®) (Shetty *et al.*, 2009), adalimumab (Humira®) (Howell *et al.*, 2005) y daclizumab (Renkl *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio de los últimos años obtiene resultados contradictorios (García-Rabasco *et al.*, 2012) en dos pacientes con PV refractario, en los que la adición de infliximab no proporcionó ningún beneficio adicional. Habría que tener en cuenta que estos resultados podrían estar limitados por la gravedad de la enfermedad de los dos pacientes incluidos, refractarios a múltiples inmunosupresores. El inhibidor de p38MAPK (KC-706) se ha empleado en un estudio multicéntrico en 15 pacientes con PV. Solamente mejoraron parcialmente 7 de ellos (Schultz, 2011).

El uso de la nicotinamida también es relativamente frecuente en el PV. Su mecanismo exacto se desconoce, pero la eficacia que ha mostrado este fármaco preparado al 4% en gel para las lesiones de mucosa oral indica que ejerce un efecto en las células diana (Iraji and Yoosefi, 2006). En las lesiones cutáneas puede estimular la adhesión de los queratinocitos a través de su efecto parasimpaticomimético. Múltiples trabajos han mostrado que los pacientes

empeoran al dejar de fumar y que este hábito tiene un efecto beneficioso sobre PV (Kridin *et al.*, 2018). 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. También se ha publicado el buen resultado de la combinación de la rapamicina oral (Sirolimus®) con altas dosis de Ig intravenosas, permitiendo un rápido control de la enfermedad y la retirada de corticosteroides (Grando *et al.*, 2011). Posiblemente el beneficio sea secundario al efecto inmunosupresor y protector sobre el queratinocito de la rapamicina, frente a la acción de los Ac.

Quizá, la utilización de células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*) en muchas enfermedades autoinmunes y neoplasias, puede ser una apertura novedosa, útil y más fisiopatológica en el tratamiento futuro del PV (Flemming, 2016; Siddiqi, Staser and Nambudiri, 2018; Walsh, Yang and Kohler, 2019; Sermer and Brentjens, 2019).

2. OBJETIVOS

Analizando los datos publicados, podemos concluir que en la actualidad sigue sin estar del todo definido el mecanismo fisiopatogénico del PV.

A su vez, los estudios de los últimos años parecen indicar que podrían ser varios los procesos que cooperan de forma coordinada, hasta llegar a la rotura de los desmosomas. Además, queda por aclarar si para producir acantólisis suprabasal en el PV los mecanismos implicados son siempre los mismos, o por el contrario se activan diferentes vías dependientes del perfil de Ac en cada paciente.

Por todo ello, en este trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos con la finalidad de contribuir a clarificar algunos interrogantes en los mecanismos que toman parte en el PV, utilizando un modelo murino de enfermedad:

1. Conocer si la ADAM10 tiene un papel prioritario en la acantólisis del PV, mediante la liberación de ligandos de los receptores HER.
2. Estudiar la función moduladora que puede desempeñar la Src sobre la metaloproteasa ADAM10.
3. Evaluar en qué medida la unión de ligandos de los receptores HER determinan la activación necesaria de estos receptores TK para el desarrollo de la acantólisis suprabasal.
4. Por último, comparar los resultados obtenidos con las diferentes fracciones de IgG-PV utilizadas, y observar si los resultados encontrados dependen del perfil de Ac de cada una de ellas. Además, comprobar si todos estos resultados pueden definir diferentes fenotipos de PV

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Obtención de los sueros.

Los estudios realizados en este trabajo se han llevado a cabo con el suero extraído de tres pacientes con PV cutáneo-mucoso atendidos en el Departamento de Dermatología de la Clínica Universidad de Navarra, y el suero de un donante sano que cedió la muestra a través del Banco de Sangre del mismo Centro sanitario. Las cuatro muestras de suero se obtuvieron con el consentimiento previo de cada uno de los pacientes.

Paciente 1 (PV1)

Paciente varón de 61 años, diagnosticado de PV en 1995. Refería la aparición de erosiones en piel de espalda con Ns positivo (véase **Fig. 19A**) y lesiones similares en mucosa oral (véase **Fig. 19B**), desde hacía 2 años. Se realizó biopsia cutánea encontrándose acantólisis suprabasal, y los estudios de IFD demostraron la presencia de depósitos de IgG alrededor de los queratinocitos. Los estudios de IFI, utilizando esófago de mono como sustrato, fueron positivos a un título de 1/40. Se llevó a cabo tratamiento con dosis de prednisona 1 mg/kg/día, junto a azatioprina 2 mg/kg/día y además 3 sesiones de plasmaféresis.



Figuras 19A y B. Lesiones erosivas en tronco (A) además de úlceras en mucosa oral y en mucosa yugal (B) del paciente 1.

Paciente 2 (PV2)

Mujer de 65 años, con diagnóstico de PV desde hace 1 año. Había estado con dosis decrecientes de prednisona (hasta 60 mg/día) junto con azatioprina (hasta 100 mg/día), sin mejoría. Presentaba lesiones ampollosas generalizadas, con erosiones superficiales en piel (véase **Fig. 20A**) (con Ns) y también en mucosa oral (véase **Fig.**

20B). Una biopsia mostró acantólisis suprabasal, y los estudios de IFD revelaron depósitos de IgG alrededor de queratinocitos. Los títulos de Ac circulantes mediante IFI, usando esófago de mono como sustrato, mostró unos niveles de Ac de 1/2560. Se llevó a cabo tratamiento con prednisona 0.5 mg/kg/día de prednisona, junto a cuatro sesiones de rituximab (375 mg/m²) y tres sesiones de plasmaféresis.



Figuras 20A y B. Lesiones ampollasas generalizadas con erosiones en tronco y extremidades en paciente 2, con otras lesiones más evolucionadas (A). Erosiones severas en mucosa gingival (B).

Paciente 3 (PV3)

Varón de 59 años, diagnosticado de PV hacía 5 años. Refería importante afectación en piel y mucosas, sin buena respuesta a tratamiento con corticosteroides sistémicos y azatioprina. En la exploración física presentaba erosiones generalizadas, con afectación severa de mucosa oral, ocular y genital (véase **Figs. 21A y 21B**). Una biopsia reveló la presencia de acantólisis suprabasal. Los estudios de IFD mostraron depósitos pericelulares en la epidermis, y mediante IFI, utilizando esófago de mono, se encontró un título positivo de Ac pericelulares frente a los queratinocitos, de 1/1280. Se instauró tratamiento con prednisona 1 mg/kg/día, junto a azatioprina 2 mg/kg/día y 3 sesiones de plasmaféresis.



Figuras 21A y B. Lesiones erosivas generalizadas, con Ns positivo, en polo cefálico, tronco y extremidades (A). El paciente presentaba lesiones similares extensas, en mucosa oral (B) ocular y genital.

Los tres pacientes cumplían los criterios establecidos para el diagnóstico de PV (Otten *et al.*, 2014). A su vez, presentaban las características para diagnosticar a los tres pacientes de PV cutáneo-mucoso (Amagai, Tsunoda, *et al.*, 1999)

3.2. Caracterización de los sueros.

Para la caracterización de los sueros de los pacientes con PV, se siguieron los criterios establecidos en la literatura (Ruocco *et al.*, 2005), y utilizados en estudios anteriores de nuestro grupo (Pretel *et al.*, 2009; España *et al.*, 2013; Gil *et al.*, 2012; Marquina *et al.*, 2008; Sánchez-Carpintero *et al.*, 2004).

3.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Para determinar el título de Ac 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 sustrato usado fue el esófago de mono, utilizando IgG anti-humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ASA, *Byosystems*, Barcelona, España). Los valores que se obtuvieron figuran en la información aportada de cada paciente, mientras que el resultado fue negativo para SN. Finalmente, los sueros que se utilizaron mostraron los siguientes títulos después de la purificación IgG-PV1: 1/40; IgG-PV2: 1/160; IgG-PV3: 1/160.

3.2.2. ELISA de desmogleína 1 y desmogleína 3

Para la determinación de la presencia de Ac para Dsg1 y Dsg3 en los sueros humanos empleados, se utilizó un *kit* comercial (Dsg1 y Dsg3 ELISA kit, *MBL Bion*, Ref: RG-M7593-D).

Se trata de un ELISA *sandwich*, en el que los pocillos de la placa están recubiertos con Ac contra Dsg1 o contra Dsg3, para poder detectar la presencia en el suero de ambas desmogleínas por separado y provisto de calibradores con una concentración conocida para cada una de las proteínas, así como un calibrador que llaman negativo y que es suero humano control, que permite comprobar que la técnica se ha realizado correctamente y realizar los cálculos de las concentraciones. Se siguieron las indicaciones del prospecto para realizar la técnica. Se testaron por triplicado tanto los calibradores como los sueros, estos últimos a una dilución 1/100, añadiéndose un volumen de 100 µl por pocillo, y se realizó una incubación de una hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron los lavados y se añadieron 100 µl por pocillo del Ac secundario marcado con peroxidasa y se incubó la placa durante una hora a temperatura ambiente. Tras los lavados, se añadieron 100 µl por pocillo de sustrato TMB, incubándose durante treinta minutos. Pasado ese tiempo, se paró la reacción añadiendo la solución stop y se procedió a la lectura a 450 nm en el espectrofotómetro (TECAN Sunrise™ Absorbance Microplate reader). Para el cálculo de las concentraciones en las muestras se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades (U/ml)} = \frac{A_{450} \text{ <muestra> } - A_{450} \text{ <calibrador negativo>}}{A_{450} \text{ <calibrador Dsg> } - A_{450} \text{ <calibrador negativo>}}$$

* A₄₅₀: absorbancia (densidad óptica, OD) a 450 nm.

La interpretación de los valores se indica en la siguiente tabla (**Tabla 3**):

	Dsg1	Dsg3
Negativo	<18	<19
Positivo débil	18-36	19-37
Positivo	≥36	≥37

Tabla 3. Interpretación de valores de Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3

3.2.3. ELISA de desmocolina 2 y desmocolina 3

La determinación de la presencia de Ac anti-Dsc2 y anti-Dsc3 se realizó mediante ELISA *sandwich*, y fue llevado a cabo por el Dr. Hashimoto y D. Ishii del Departamento de Dermatología de *Kurume University School of Medicine*, and *Kurume University Institute of Cutaneous Cell Biology*, Kurume, Fukuoka, Japan, según el protocolo indicado en Ishii, *et al*, en el que se utilizan RPs (proteína recombinante soluble) de Dsc1-3 expresadas en células de mamífero (Ishii *et al.*, 2015).

En lo que se refiere a la preparación de las placas, se utilizaron Placas Maxisorp (*Thermo Fisher Scientific, Nunc A/S, Roskilde, Denmark*), se añadieron 100 μ L of 5 μ g/ml de Dsc RPs (proteína recombinante soluble) purificada diluida en *buffer* TBS–Ca (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl and 1 mmol/L CaCl₂) y se dejaron incubar a 4 °C durante una noche, con el fin de fijar el Ac de captura. Pasado este tiempo, se eliminó el líquido y se bloqueó la placa con *buffer* de bloqueo (TBS–Ca *buffer* que contenía 10% suero bovino, 5% de sacarosa y 0.05% de azida sódica) durante tres horas a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de bloqueo, se dejaron secar las placas durante dos horas a temperatura ambiente y se almacenaron a 4° C.

Para realizar la detección de los Ac, se incubaron las placas con 100 μ l de suero humano diluido 1:100 en *buffer* TBS-CA con un 2% de suero bovino durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados en *buffer* de lavado (TBS–Ca *buffer* con 0.05% Tween 20). A continuación, se incubaron las placas durante una hora a temperatura ambiente con 100 μ L of IgG anti-humana conjugada con peroxidasa (MBL) diluida 1:8000 en *buffer* TBS–Ca con 1% de albúmina bobina. Se realizaron cuatro lavados en el *buffer* de lavado y se incubó la placa con 100 μ l de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate, Moss Inc., Pasadena, MD, U.S.A.) durante treinta minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 100 μ L of HCl 0,5 mol/L y se midió la absorbancia como unidades de densidad óptica (OD) a 450 nm.

Los resultados de los estudios de ELISA en los tres sueros PV estudiados se muestran en la **Tabla 3**. Como puede verse, las fracciones PV1, PV2 y PV3 presentaban un perfil diferente de Ac anti-Dsg y anti-Dsc.

Títulos de Ac en los 3 sueros de los pacientes (IgG PV1-PV3)					
Sueros	Indice Anti-Dsg1 ¹	Indice Anti-Dsg3 ¹	Anti-Dsc1 (DO) ²	Anti-Dsc2 (DO) ²	Anti-Dsc3 (DO) ²
PV1	Positivo 134	Positivo 45	Negativo (<0.2)	Negativo (<0.07)	Negativo (<0.12)
PV2	Positivo 42	Positivo 174	Negativo (<0.2)	Negativo (<0.07)	Negativo (<0.12)
PV3	Positivo 103	Positivo 177	Negativo (<0.2)	Positivo 0.1	Positivo 1.118

¹Indice negativo fijado en ≤18 para Dsg1 y ≤19 para Dsg3;
²Densidad óptica (DO). DO positiva si Dsc1 >0.2, Dsc2 >0.07, Dsc3 >0.12).

Tabla 4. Perfil de Ac anti-Dsg y anti-Dsc de PV1, PV2 y PV3.

3.3. Purificación de sueros

La purificación de los sueros se llevó a cabo siguiendo el protocolo anteriormente utilizado y descrito, introduciendo algunas modificaciones (España *et al.*, 1997).

El suero de los pacientes con PV se obtuvo a partir de extracciones de sangre periférica obtenida mediante plasmaféresis, durante la fase activa de la enfermedad, siguiendo el criterio establecido anteriormente (Amagai, Komai, *et al.*, 1999). La sangre fue recogida en bolsas que se almacenaron a -40°C hasta su uso. Se partió de 600 ml de sangre que se repartieron en alícuotas de 50 ml en tubos Falcon, a los que se añadieron 1,4 ml de trombina (*Thrombin from bovine 1-KU. Referencia: T46481KU. Proveedor: SIGMA*), previamente reconstituida en 4 ml de PBS 1X (7 U/ml de plasma), con el fin de eliminar los factores de coagulación. Se colocaron los tubos Falcon en un baño a 37°C durante 30 minutos en agitación suave. Pasado ese tiempo, se extrajo el suero de los coágulos formados con una pipeta Pasteur, se colocó en un vaso de precipitado en agitación con mosca y se fue añadiendo gota a gota el mismo volumen de persulfato amónico saturado al 100 % (pH=7,4-7,6) (también el persulfato se mantuvo en agitación durante su adición) con el fin de precipitar las proteínas y se dejó en agitación a 4°C durante una noche. A continuación, se repartió en tubos Falcon de 50 ml y se realizó una centrifugación a 4000 rpm, 4°C durante 30 minutos.

Se desechó el sobrenadante por decantación y se dejaron secar los pellets durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendieron los pellets en PBS 1X y se repartió el líquido en tripas de diálisis que se introdujeron en un vaso de precipitado con PBS 1X y se mantuvo en agitación durante una noche a 4°C, con el fin de eliminar el persulfato amónico. Se realizaron dos cambios de PBS 1X, uno pasados 30 minutos y otro, pasadas dos horas. Tras la diálisis se filtró la muestra (filtro de 0,8 µm) y se almacenó a -40°C en tubos Falcon para su posterior purificación.

La purificación de las IgG se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando el ÄKTA TM FPLC TM, *Amersham Biosciences*. Previo a su paso por el FPLC, la muestra se centrifugó a 10000 rpm, a 4°C y se filtró (tamaño del poro: 0,8 µm). También se filtraron las soluciones de PBS 1X y glicina que se utilizaron (filtro de 0,8 µm). Se utilizaron columnas de proteína A con membrana de *Staphylococcus aureus* a la que se unen las fracciones Fc de las IgG. (*Hitrap protein A HP*. Referencia: 17-0403-01, *GE Healthcare*). Las fracciones de IgG unidas a la membrana fueron eluidas con glicina (2M, pH=3) y se neutralizaron con una solución de Tris-base (2M, pH=8,8, 125 µl/ml de eluido). A continuación, se concentró la fracción eluida por centrifugación, utilizando centricones (*Amicon Ultra-15, Centrifugal filters*. Referencia: UFC910008. Proveedor: Merck). La centrifugación se realizó a 10.000 rpm a temperatura ambiente. Una vez concentrada la muestra, se midió la concentración de IgG bien mediante nefelometría empleando IgG anti-humana de cabra (*Beckman Array 360 System; Beckman Instruments Kit, Clinical Instruments Division*), o bien por espectrofotometría utilizando el Nanodrop (longitud de onda 280 nm), obteniendo unos valores comprendidos entre 7000 mg/dl y 10000 mg/dl. Las fracciones de IgG purificadas se almacenaron en tubos *ependorf* en alícuotas de 500 µl a -40°C hasta su uso.

3.4 Modelo de experimentación animal: transferencia pasiva

En los ensayos con animales se siguieron las guías dadas por el Comité de Ética para la experimentación animal de la Universidad de Navarra y los estudios fueron realizados de acuerdo con las guías de la *Federation of European Laboratory Animal Sciences Association* (FELASA), así como de las normas establecidas por el Gobierno de Navarra.

Se utilizaron ratones C57BL/6J recién nacidos de entre 24-48 horas y un peso comprendido entre los 1.5-2 g. Las colonias de progenitores fueron adquiridas en *Charles River*, con una edad entre 8-9 semanas y se distribuyeron en tríos de 2 hembras y un macho. Se mantuvieron en las instalaciones del CIFA Universidad de Navarra.

La administración tanto de las fracciones de IgG como de los inhibidores se realizó por vía intradérmica en la espalda de los animales, utilizando una jeringa de 30G (Omnican®50, 9151125 Braun). Los animales tras la separación de su madre fueron mantenidos en una caja compartimentada con calor a 25-27°C en una habitación a 25°C y fueron sacrificados por decapitación.

Se realizaron dos tipos de estudios. Por un lado, aquellos dirigidos a analizar el tiempo de aparición de los signos clínicos (Ns) e histológicos (acantólisis suprabasal) del PV, así como los mecanismos moleculares intracelulares implicados en el desarrollo de la enfermedad, y por otro lado aquellos procedimientos dirigidos a estudiar la eficacia de los inhibidores empleados, así como su influencia en las cascadas de señalización implicadas.

En el primer tipo de ensayos, se realizó una única administración de la fracción de IgG correspondiente a una dosis de 2 mg/g y se sacrificó a los animales pasados 15 y 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 y 12 horas.

En los ensayos con inhibidores, se administró el inhibidor dos horas antes de la inyección de la fracción de IgG-PV o IgG-SN. Justo antes de sacrificar a los animales, se estudió la presencia de Ns (que se realizó cogiendo un pellizco de la piel de la zona de inyección) y se aplicó la siguiente escala de valoración, siguiendo nuestros estudios anteriores (Sánchez-Carpintero *et al.*, 2004; Pretel *et al.*, 2009; Marquina *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2012; España *et al.*, 2013; Pelacho *et al.*, 2004): (-) negativo; (1+) despegamiento epidérmico de menos del 33% de la zona de inyección; (2+) despegamiento epidérmico entre el 33 y 66% de la zona de inyección; (3+) despegamiento epidérmico mayor del 66% de la zona de inyección; y (4+): despegamiento más allá de la zona de piel inyectada (véase **Fig. 19**, Resultados).

Los animales fueron sacrificados pasados 15 y 30 minutos, 1, 2, 4 y 12 horas y se recogió muestra de piel de la zona de inyección. Las muestras para el estudio histológico se fijaron en formol (3,7-4%) durante 24 horas y a continuación, se

colocaron en etanol 70% para su posterior procesamiento e inclusión en parafina. Las muestras para la determinación de la actividad de ADAM10, así como para la determinación de los niveles de ligandos EGF y BTC se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El peso de los tejidos recogidos se encontraba entre los 80-120 mg. En la **Figura 22** se indica el protocolo seguido de administración y sacrificios realizados.

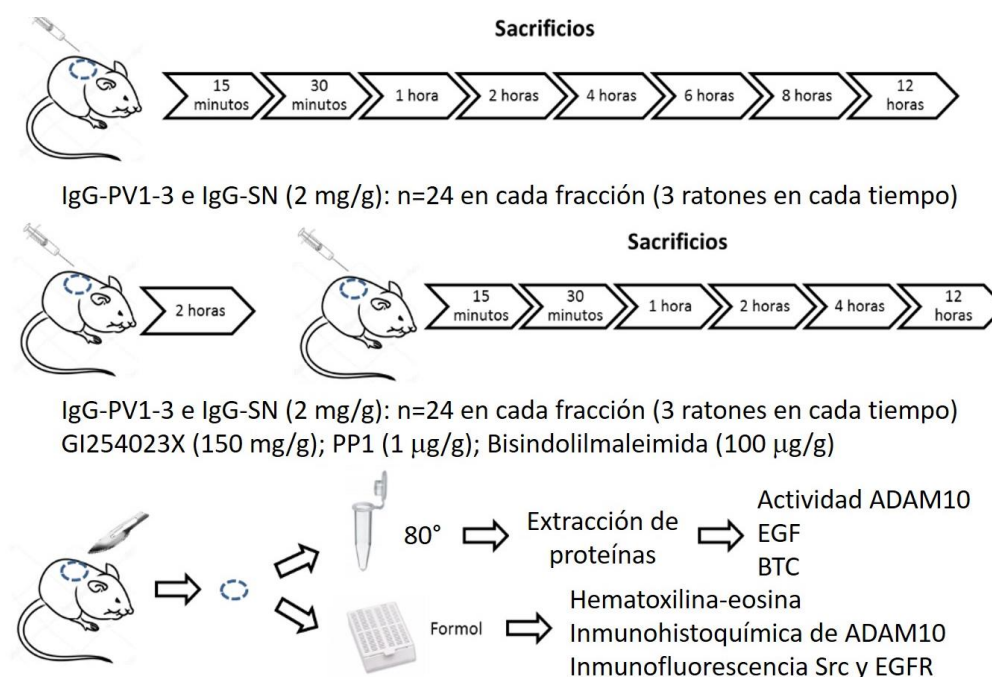


Figura 22. Protocolo seguido para la administración y sacrificio de los ratones.

3.5. Características de los inhibidores

En la **tabla 5** se indica el nombre comercial, la referencia el proveedor, y la dosis administrada de los inhibidores utilizados en el estudio.

Nombre del inhibidor	Referencia y proveedor	Dosis	Inhibición de
CL-387,785	233100, Calbiochem	10 mg/Kg	HER
GI254023X	AOB 3611, Aobious SML0789-5MG, Sigma	150 mg/Kg	ADAM10
PP1 Análogo	529579, Calbiochem	1 mg/Kg	Src
Cetuximab	Erbitux®, MerckSerono	100 µg/g	unión del EGFR al EGF

Tabla 5. Características de los inhibidores empleados.

Puesto que se utilizó DMSO para la preparación de los inhibidores, se realizó una prueba administrando diferentes concentraciones de DMSO por vía intradérmica a ratones recién nacidos. Las dosis administradas fueron: 2,2 mg/kg, 1.1 mg/kg y 0.5 mg/kg, teniendo en cuenta que la Dosis letal 50 (DL50) del DMSO en ratón es de 2,5-8,5 g/kg. Pasadas 14 horas los animales se encontraban vivos y no se observaron datos clínicos que mostraran toxicidad.

- **N-[4-[(3-Bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida**

Es un inhibidor de las isoformas HER. *In vivo* actúa como un inhibidor irreversible de la actividad quinasa, así como de la autofosforilación en residuos tirosina del EGFR. La dosis administrada de 10 mg/Kg se basó en estudios previos (Gil et al, 2012). Para la administración se preparó una solución en DMSO a una concentración de 2 mg/ml que se llevó hasta una concentración de 0,4 mg/ml con suero fisiológico.

- **Ácido (2R,3S)-3-(Formil-hidroxi-amino)-2-(3-phenil-1-propil) butanoico [(1S)-2,2-dimetil-1-metilcarbamoil-1-propil]amide (GI254023X)**

Es un potente inhibidor selectivo de la metaloproteasa ADAM10. La dosis administrada de 150 mg/kg la elegimos en base a trabajos publicados (Inoshima *et al.*, 2011; Inoshima, Wang and Bubeck Wardenburg, 2012). Para la administración se preparó una solución a una concentración de 60 mg/ml en DMSO, que se llevó hasta una concentración de 6 mg/ml con *buffer* carbonato 0.1M. Con el fin de seleccionar la dosis mínima de GI254023X que inhibía la enfermedad, se administró PV2 en combinación con diferentes concentraciones de GI254023X (véase **Fig. 23**) según la pauta de administración que seguimos para la eficacia (administración del suero, pasadas dos horas se administró el inhibidor y tras 12 horas, se llevó a cabo la valoración clínica y recogida de muestras para tinción de H-E).

- **Cetuximab**

Es un Ac IgG1 monoclonal quimérico producido en una línea de células de mamíferos (Sp2/0) mediante tecnología de ADN recombinante. Inhibe la unión del EGF al EGFR. La dosis administrada de 100 µg/g se basó en un estudio bibliográfico (Heinzmann *et al.*, 2018). Para la administración se preparó una solución a una concentración de 4mg/ml en suero fisiológico.

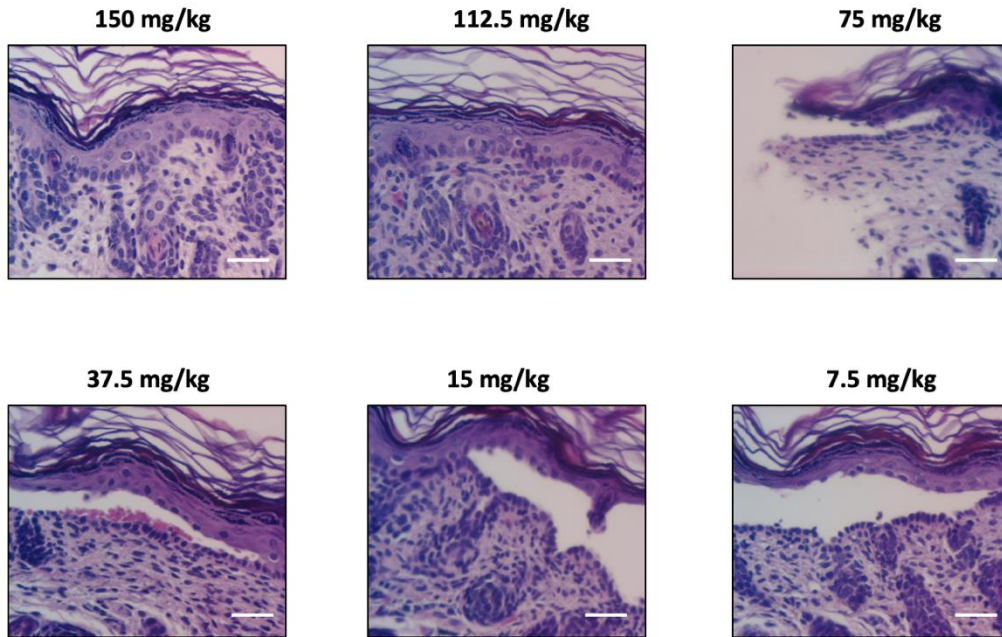


Figura 23. Efecto en la inhibición de la acantólisis administrando diferentes dosis del inhibidor de ADAM 10 (GI254023X) con el fin de seleccionar la dosis mínima que inhibía la enfermedad.

- **Amino-1-tert-butil-3-(1'-naftil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, 1-Na PP1, 1-NA-PP1 (PP1 analog)**

El PP1 es un potente inhibidor reversible de las TKs de la familia Src, que actúa como competidor del ATP por el sitio de unión al que este se une y activa a las quinasas. La dosis utilizada de 1 mg/kg se basó en estudios previos realizados por nuestro grupo (Gil *et al.*, 2012). Para la administración se preparó una solución a una concentración de 0.5 mg/ml en DMSO, que se llevó hasta una concentración de 0.04 mg/ml con suero fisiológico.

3.6. Técnicas histológicas: tinción de hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Valoración de la acantólisis.

Para llevar a cabo las técnicas histológicas, se realizaron cortes de 3 μ m que, tras ser desparafinados en baño de xileno, fueron hidratados en alcoholes decrecientes (96%, 70% y 50%) y colocados en agua destilada para su posterior tinción con hematoxilina-eosina o realización de las técnicas de inmunohistoquímica e IF.

Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina permitieron el estudio de la presencia o ausencia de acantólisis suprabasal. La valoración del grado de acantólisis suprabasal se realizó de acuerdo con la siguiente escala, basada en la

experiencia previa de nuestro grupo (Sánchez-Carpintero *et al.*, 2004; Pretel *et al.*, 2009; Marquina *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2012; España *et al.*, 2013; Pelacho *et al.*, 2004) (-) negativo (ausencia de acantólisis); (1+) acantólisis localizada en un tercio de la preparación; (2+) (acantólisis localizada en dos tercios de la preparación); (3+) (acantólisis en la epidermis superior a dos tercios de la superficie de la muestra); y (4+) despegamiento completo de la epidermis (véase **Fig. 19**, Resultados).

Los Ac primarios que se utilizaron para las técnicas de inmunohistoquímica e IF fueron: *Rabbit Polyclonal anti-ADAM10 antibody* (AB1997, ABCAM) y *Rabbit Polyclonal phospho-Src-family (Tyr416) antibody* (2101, Cell Signaling). Los Ac secundarios que se utilizaron fueron: Envision+System HRP Rabbit (DAB) (K4011, DAKO), *Polyclonal Swine Anti-rabbit Immunoglobulins/Biotinylated* (E0353, DAKO) y *Streptavidine Protein HRP* (21126, Thermo Fisher Scientific). Otros reactivos que se utilizaron fueron: *Peroxidase blocking reagent* (S202330, DAKO) y *Amplification kit for immunohistochemistry TSA Fluorescein System* (NEL 701001KT, Perkin Elmer) (Véase **Tabla 6**).

	Nombre (referencia, proveedor)	Dilución
Ac primarios	<i>Rabbit Polyclonal anti-ADAM10 antibody</i> (AB1997, ABCAM)	1:900
	<i>Rabbit Polyclonal phospho-Src-family antibody (Tyr416)</i> (2101, Cell Signaling)	1:50
	<i>Rabbit Polyclonal phospho-EGFR (Tyr845)</i> (44-781G, Thermo-Fisher)	1/200
Ac secundarios	<i>Envision + System HRP Rabbit (DAB)</i> (K4011, DAKO)	
	<i>Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated</i> (E0353, DAKO)	1:100
	<i>Streptavidine Protein HRP</i> (21126, Thermo Fisher Scientific)	1:100

Otros reactivos	<i>Peroxidase blocking reagent (S202330, DAKO)</i>	
	<i>Proteinase K, Ready-to-Use, Ready-to-use (S3020, DAKO)</i>	
	<i>Amplification kit for immunohistochemistry TSA Fluorescein System (NEL 701001KT, Perkin Elmer)</i>	1:50

Tabla 6. Características de los Ac primarios, secundarios y de los reactivos empleados.

El estudio inmunohistoquímico de la expresión de ADAM10 se llevó a cabo según el siguiente procedimiento, realizándose todas las incubaciones en cámara húmeda. Tras el desenmascaramiento con proteinasa K a una concentración de 20 µg/ml, temperatura de 37°C durante 30 minutos, se bloqueó la peroxidasa durante 15 minutos y se añadió el Ac primario a una dilución de 1:900, y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubó la muestra con el Ac secundario *Envision HRP Rabbit* durante 30 minutos, para posteriormente realizar el revelado con DAB (5 minutos) y contrateñir las muestras con hematoxilina.

En el caso de la IF para detectar la expresión de la forma activa de la Src (Tyr416 p-Src), el desenmascaramiento se realizó por calor en olla a presión durante 30 minutos a 95°C en una solución *buffer* de Tris-EDTA (10/1 mM, pH=9). A continuación, se bloqueó la peroxidasa durante 15 minutos y se añadió el Ac primario a una dilución (1/50) y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente incubó con el Ac secundario *Polyclonal Swine anti-rabbit* a una dilución 1:100, durante 45 minutos a temperatura ambiente, a continuación, con la *Streptavidine-HRP* a una dilución 1:100, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó un protocolo de amplificación de la señal utilizando *TSA Fluorescein System*, para lo cual las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con *Fluorescein Tyramide Reagent* a una dilución 1:50 en *amplification diluent*. La expresión de p-EGFR (Tyr845) se realizó también por IF, siguiendo el mismo protocolo de desenmascaramiento que el utilizado para la detección de la forma activa de Src. A continuación, se dejó incubar la muestra

durante una noche a 4^o con el Ac primario a una dilución (1/50), y posteriormente 45 minutos con el Ac secundario Polyclonal Donkey anti-rabbit a una dilución 1/200. Finalmente se añadió Hoescht para la tinción nuclear.

Para la adquisición de las imágenes se utilizaron los microscopios Nikon E-800 y el *Confocal Laser Scanning microscope Zeiss LSM 800*.

Se utilizaron como controles positivos las tinciones de IF para pSrc (Tyr416) y pEGFR (Tyr845) en muestras de biopsias de cáncer de mama (véase **Fig. 24**).

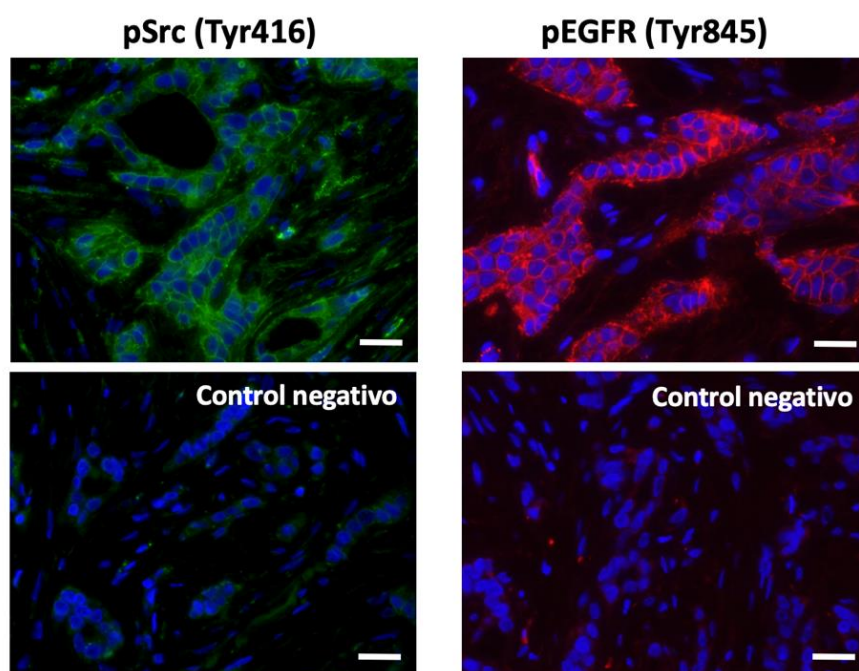


Figura 24. Tinciones de IF para pSrc (Tyr416) -en verde- y para pEGFR (Tyr845) -en rojo- en biopsias de cáncer de mama. Las tinciones para los controles negativos se incluyen a continuación. La tinción nuclear se muestra en azul. (Barra de escala: 25 μ m).

3.7. Método de extracción de proteínas y medición de la concentración por Bradford: Medición de actividad de ADAM10 y de ligandos de EGFR

Se realizó la extracción de las proteínas de las muestras de piel almacenadas a -80^oC. Se homogeneizaron los tejidos utilizando el un politrón (ultraturax) a la máxima potencia, en 250 μ l de *buffer*. En el caso de la medición de la actividad de ADAM10 se utilizó el *buffer* del *kit*. Para la medición de los niveles de EGF y BTC se utilizó un *buffer* con PBS (*Phosphate buffered saline*) e inhibidores de proteasas (CompleteTM, *Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, 118361700001, ROCHE).

A continuación, se dejaron las muestras en hielo durante 15 minutos y se realizó una centrifugación a 10000xg, 15 minutos a 4°C en el caso de la medición de la actividad de ADAM10 y una centrifugación a 16000xg, 60 minutos a 4°C en el caso de la medición de los niveles de EGF y BTC. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante, un alícuota de 10 µl para la medición de proteínas y el resto fue almacenado en alícuotas de 50 µl a -80°C para su posterior utilización.

La medición de proteínas se realizó mediante el método Bradford, para lo cual se realizó una dilución 1/3 de las muestras en el *buffer* de extracción, de la que se añadieron 1,5 µl a 250 ml de reactivo de Bradford (*Protein assay dye reagent concéntrate*, 500-0006 BIO-RAD) diluido 1:5 en agua destilada. Se preparó una curva patrón con BSA (*Albumin, from bovine serum*, A4503 SIGMA) de concentraciones decrecientes de 10 a 0.5 mg/ml, de las que se añadieron 1,5 µl. El ensayo se realizó en placa (*Microtest Plate 96-Well flat bottom*, 82.1581 Sarstedt) por duplicado, en dos de los pocillos se añadió solo reactivo de Bradford para utilizarlo como blanco y se midió en espectrofotómetro (*Sunrise™ TECAN*) a 595 nm, realizándose también una medición a 450 nm para la corrección de la placa. Los cálculos se realizaron dividiendo las medidas a 595 nm entre las obtenidas a 450 nm. Utilizando el programa *Excel* se obtuvo la recta de regresión con los valores de absorbancia de la curva patrón y por extrapolación los valores de la concentración de proteínas en las muestras.

Nombre	Referencia	Proveedor	Cantidad de proteína (µg)	Técnica
<i>Senolyte® 520 ADAM10 activity assay kit (Fluorimetric)</i>	AS-72226	ANASPEC	100	Fluorimetría
<i>EGF Quantikine ELISA kit</i>	MG00	R&D Systems	300	ELISA sandwich
<i>Human BTC ELISA kit</i>	Ab99987	ABCAM	600	ELISA sandwich

Tabla 7. Kits utilizados para la medición de la actividad de ADAM10 y para medir los niveles de ligandos (EGF y BTC)

En la **tabla 7** se indican los *kits* utilizados para la medición de la actividad de ADAM10 por fluorimetría de los niveles de EGF y BTC por ELISA *sandwich* (*enzyme-linked immunosorbent assay*), así como la cantidad de proteína testada en cada caso. Las técnicas se realizaron siguiendo el procedimiento indicado en el prospecto de los *kits*. En todos los casos, previamente se optimizaron las técnicas para la medición de nuestras muestras.

3.7.1. Medición de la actividad de ADAM10

La puesta a punto en el caso de la actividad de ADAM10 se realizó probando concentraciones de 100, 200 y 300 μg de proteína de muestras de animales administrados con PV1-IgG, PV2-IgG o NHS-IgG y sacrificados pasada 1 hora (véase **Fig. 25**).

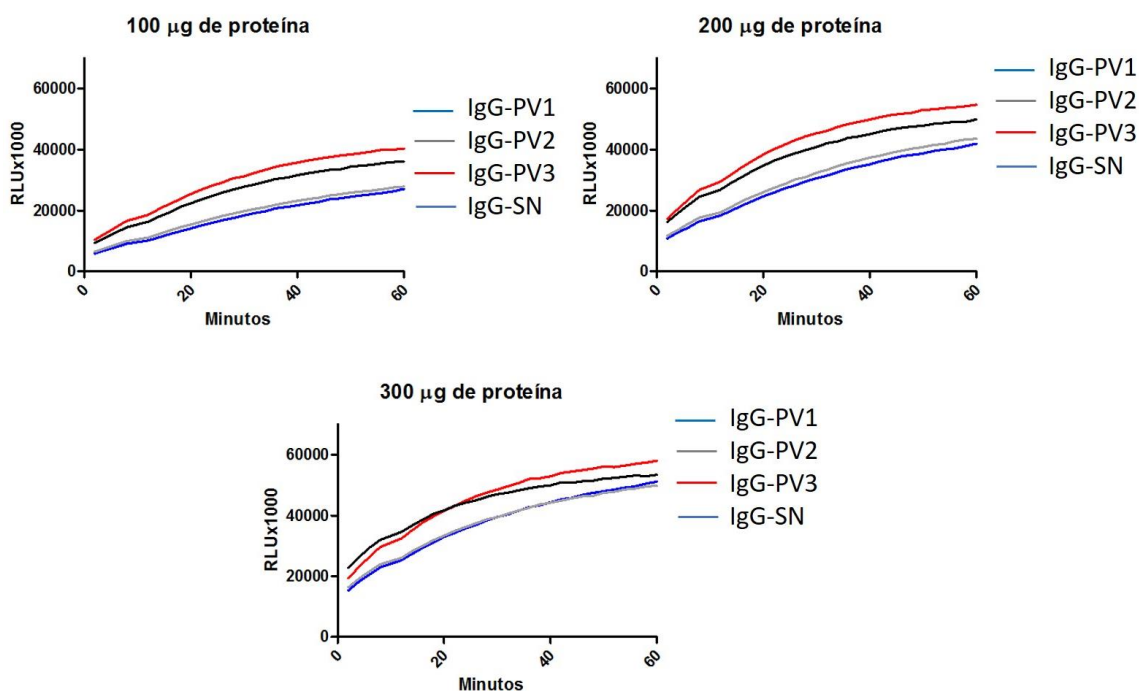


Figura 25. Puesta a punto de la actividad de ADAM10

Además, se validó la técnica preparando una solución 10 μM en DMSO de GI254023X y de GM-6001 (inhibidor de ADAM10 proporcionado en el *kit*), de la que se añadieron 40 μl a muestras que habían presentado alta actividad de ADAM10. Los

resultados que se obtuvieron fue una bajada de la actividad de 8 veces con el GI2543X (véase **Fig. 26**)

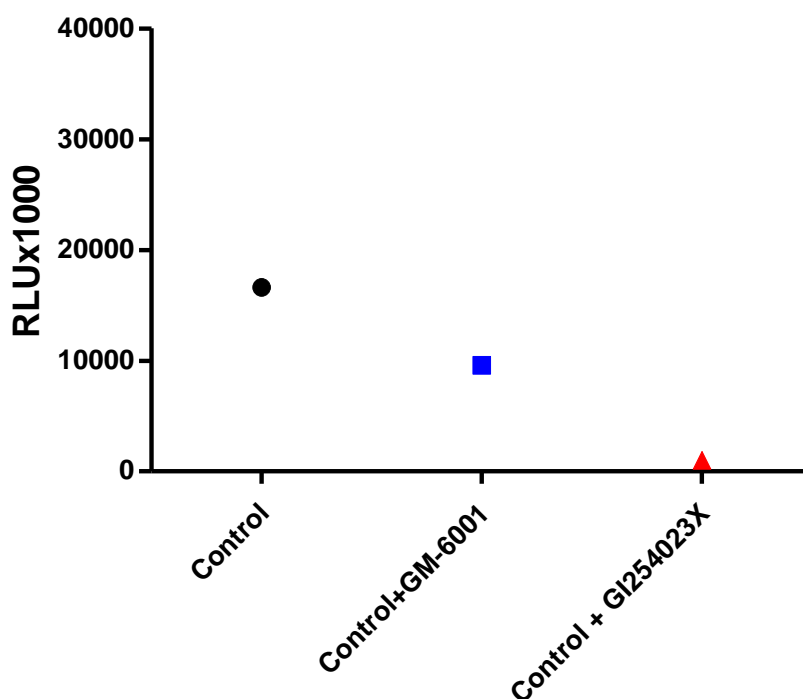


Figura 26: Inhibición de la actividad de ADAM10 por los inhibidores GI254023X y GM-6001. RLU (*relative light unit*): unidades relativas de luz.

Para la medición de la actividad de ADAM10, se descongelaron las muestras en hielo y se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar precipitados que se hubieran podido formar durante el almacenamiento y se recogió el sobrenadante. Se prepararon las muestras a una concentración en el *buffer* de extracción tal que en un volumen de 50 μ l hubiera 100 μ g de proteína total. El ensayo se realizó en placas negras (*Black 96-well immuno plates, Maxisorp, 9502867 Fisher Scientific*). Se utilizó como control positivo el enzima ADAM10 proporcionado en el *kit*, a una concentración de 0.2 μ g/ml y del que se añadieron 50 μ l. Se prepararon los estándares para el control de la técnica siguiendo las indicaciones del prospecto. Se añadieron a la placa 50 μ l de las muestras, el control positivo y los estándares, y a continuación 50 μ l del sustrato (que previamente se había diluido 1:100 y llevado a 37°C). Se realizó la medición en el *FLUOstar OMEGA* (BGM LABTECH) durante 1 hora a 37°C, tomándose medidas cada 20 minutos. Para los cálculos, se tomaron las medidas de fluorescencia a los 20 minutos.

3.7.2. Medición de los niveles de EGF y betacelulina

La determinación de los niveles de EGF y de BTC se realizó mediante ELISA sándwich. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. La puesta a punto de la técnica se realizó testando concentraciones de proteínas de 150 a 400 μg en el caso de EGF (véase **Fig. 27**) y de 300 a 600 μg en el caso de la BTC (véase **Fig. 28**)

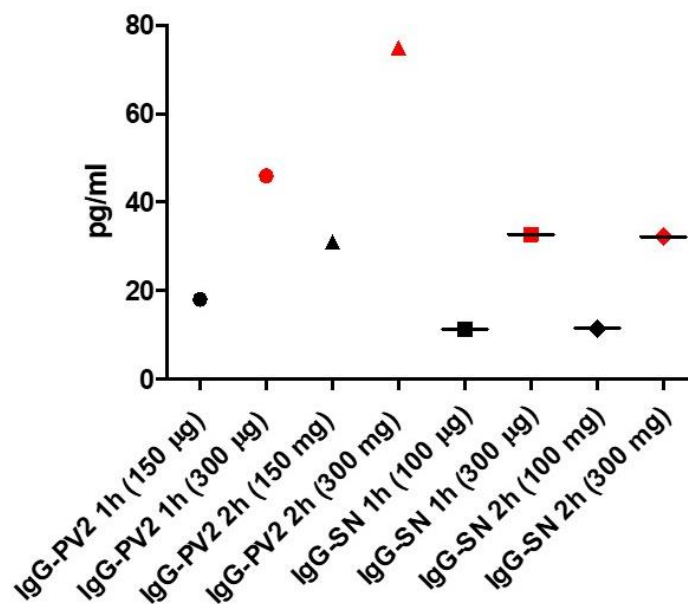


Figura 27. Puesta a punto del ELISA de EGF.

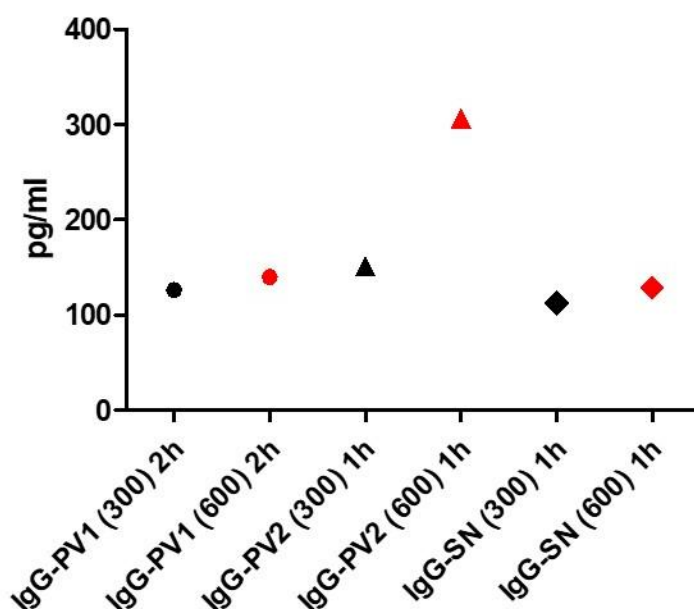


Figura 28. Puesta a punto del ELISA de BTC.

Para la medición de estos dos ligandos, se descongelaron las muestras en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar precipitados que se hubieran podido formar durante el almacenamiento y se recogió el sobrenadante.

En el caso de la medición de EGF, las muestras se llevaron con el *buffer* del *kit* utilizado para la preparación de los calibradores (Calibrator Diluent RD5-26) a una concentración tal que en 50 μ l hubiera 300 μ g de proteína. Siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, se añadieron 50 μ l de *Assay Diluent RD1-21* y a continuación 50 μ l de las muestras, el control y los estándares. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente se realizaron 4 lavados. Se añadieron 100 μ l de secundario *Mouse EGF Conjugate* y tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente se realizaron 4 lavados. Posteriormente se añadieron 100 μ l de *Substrate solution*, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se añadieron 100 μ l de *stop solution* y se realizaron dos mediciones en espectrofotómetro, una a 450 nm y otra a 540 nm para realizar la corrección de placa a 540 nm. Los cálculos se realizaron restando las medidas a 450 nm las obtenidas a 540 nm. Utilizando el programa *Excel* se obtuvo la recta de regresión con los valores de absorbancia de la curva patrón y por interpolación los valores de la concentración de proteínas en las muestras.

En el caso de la medición de BTC, las muestras se llevaron con el *buffer* del *kit Assay Diluent B* a una concentración tal que en 100 μ l hubiera 600 μ g de proteína. Se añadieron 100 μ l de las muestras y estándares y se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación suave. A continuación, se realizaron cuatro lavados y se añadieron 100 μ l de 1X *Biotinylated Betacellulin detection antibody* y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Tras la incubación se realizaron 4 lavados y se añadieron 100 μ l de 1X *HRP-Streptavidine solution*, se incubó durante 45 minutos con agitación suave. Se realizaron 4 lavados y se añadieron 100 μ l de TMB. Tras una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y con agitación suave, se añadieron 50 μ l de *Stop Solution* y se realizó una lectura en espectrofotómetro a 450 nm y otra para la corrección de placa a 540 nm. Los cálculos se realizaron restando las medidas a 450 nm las obtenidas a 540 nm. Utilizando el programa *Excel* se obtuvo la recta de regresión

con los valores de absorbancia de la curva patrón y por extrapolación los valores de la concentración de proteínas en las muestras.

3.8. Estadística

Los datos se analizaron aplicando una ANOVA factorial, fijando los factores tiempo y sueros/tratamientos. Con el fin de buscar posibles diferencias significativas, se realizaron comparaciones por pares en cada tiempo, utilizando el grupo IgG-SN como referencia. Se estudió la distribución normal de los datos mediante el modelo de residuales a través de la prueba de *Shapiro-Wilk* y gráficos Cuantil-Cuantil (*Q-Q plots*). El análisis de los datos se realizó con el programa Stata 12.

4. RESULTADOS

4.1. El tiempo de aparición de la acantólisis suprabasal y su intensidad en el pénfigo vulgar varía en función del perfil de anticuerpos en cada paciente y de sus niveles circulantes.

Una vez purificados los tres sueros PV y identificados los perfiles de Ac de las fracciones de IgG-PV, quisimos comprobar que cada uno de ellos reproducía la enfermedad de PV, clínica, histológicamente (por microscopía convencional y por IF), según el modelo propuesto en nuestro estudio (ver **Material y Métodos**). Pudimos comprobar que a las 12 horas los ratones inyectados con cada una de las tres fracciones de IgG-PV reproducían las lesiones de PV. La administración de IgG-SN, por el contrario, mostró unos resultados negativos. Estos hallazgos nos permitían poder trabajar con estas fracciones de IgG.

A continuación, nos planteamos cómo era el *timing* de cada una de las fracciones de IgG-PV. Es decir, quisimos saber si la presencia de un perfil de Ac diferente en cada paciente tenía una influencia directa a la hora de inducir la aparición de las lesiones (clínica e histológicamente), con una intensidad y un periodo de tiempo diferente en cada caso.

Observamos nuevamente que los ratones inyectados con IgG-PV1 y con IgG-PV2 desarrollaron el Ns (3+) a las 12 horas, pero acantólisis suprabasal (2+) ya pudimos observarla a las 8 y 6 horas, respectivamente. Los hallazgos histológicos se fueron incrementando, hasta las encontrar 3+ a las 12 horas. Por el contrario, la formación de ampollas clínicas (con Ns) inducidas por IgG-PV3 empezó a observarse más precozmente, a las 4 horas (2+), incrementándose en los controles sucesivos (4+ a las 12 h). Los hallazgos de acantólisis suprabasal se empezaron a observar a las 4 horas (2+), aumentando progresivamente en las siguientes horas, hasta llegar a 4+ a las 12 horas. (véase **Figs. 29 y 30**).

A diferencia de IgG-PV1 e IgG-PV2, tras la inyección de IgG-PV3, el desprendimiento no se limitó al área inyectada, sino que se extendió más allá de ella (4+) a las 12 horas. A las 12 horas de la inyección de IgG-SN no se observó enfermedad clínica (Ns) (0) ni histológica (no se encontró acantólisis suprabasal) (0) en los 3 ratones estudiados (véase **Figs. 29 y 30**).

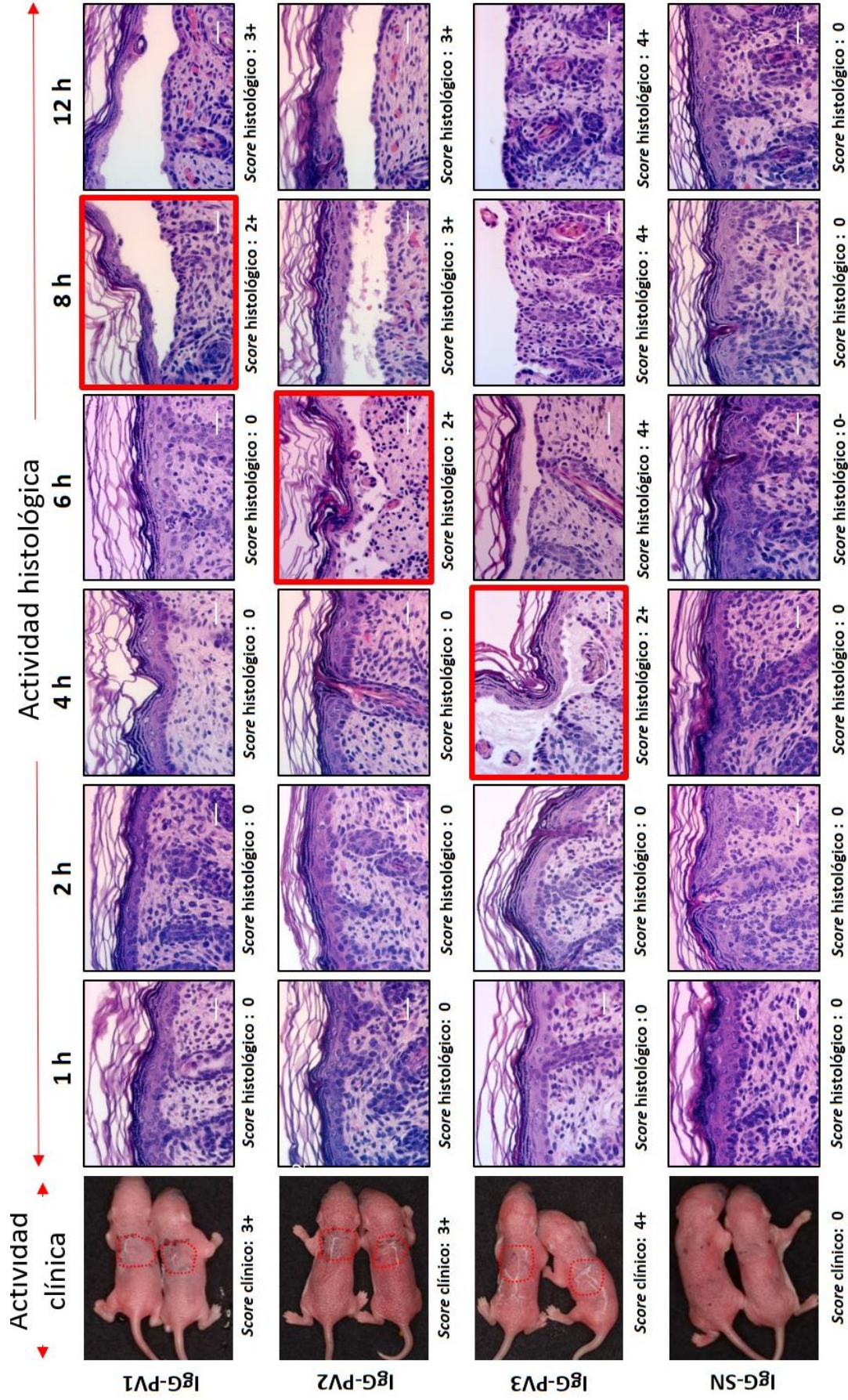


Figura 29: Score clínico e histológico a diferentes tiempos tras la administración de IgG-PV1-3 o IgG-SN. Encuadrado en rojo el tiempo al que se observó la aparición de enfermedad clínica y acantólisis.

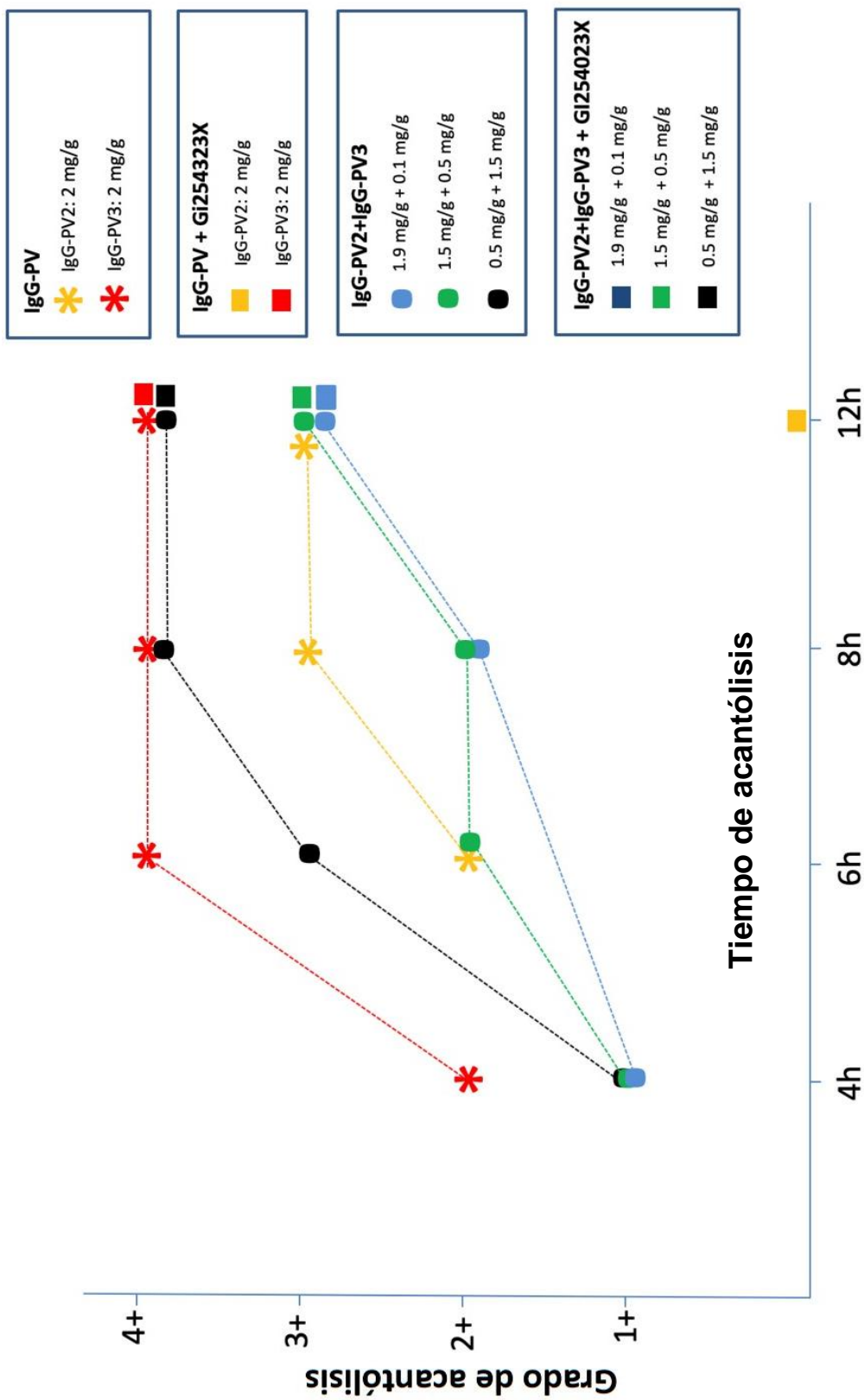


Figura 30. Score histológico (0 a 4+) de la acantólisis suprabasal en ratones sacrificados a diferentes tiempos tras la administración de diversas fracciones de IgG de pacientes con PV: IgG-PV2, IgG-PV3, IgG-PV2 + IgG-PV3 o IgG-PV en ratones pretatados con GI254023X, sacrificados a las 12 h de la administración de IgG-PV. Los resultados son las medias de tres experimentos independientes (en cada grupo, n = 3).

Así pues, pudimos comprobar que cada una de las fracciones de IgG-PV producía una intensidad de acantólisis suprabasal distinta, y con una cronología diferente, en función del perfil de Ac. Aunque IgG-PV1 y IgG-PV2 producían fragilidad cutánea (Ns positivo) de 3+ a las 12 horas, en el caso del primer paciente, con unos niveles de anti-Dsg1 mayores que los de anti-Dsg3, la acantólisis suprabasal era más tardía (8 horas) que cuando los niveles de anti-Dsg3 eran más elevados (paciente 2 con acantólisis suprabasal a las 6 horas). La presencia de anti-Dsc positivos se asoció a una acantólisis más intensa (hasta 4+) y extensa, y también más precoz (ya observada a las 4 horas). Ante estos resultados, nos planteamos si estos hallazgos tenían que ver con mecanismos intracelulares que intervenían de forma distinta en función del perfil de Ac encontrados en cada paciente.

4.2. La metaloproteasa ADAM10 se expresa en la capa basal de la epidermis, e incrementa su actividad tras la inyección de fracciones IgG de los pacientes con pénfigo vulgar, dependiendo del perfil de anticuerpos circulantes.

Tal y como comentamos, los ligandos relacionados con el EGFR tienen un papel en el PV. Por este motivo, nos planteamos como objetivo dilucidar la función de la ADAM10 durante el mecanismo de pérdida de adhesión de queratinocitos en el PV. En primer lugar, estudiamos la expresión total de la proteína ADAM10 en la epidermis. El análisis inmunohistoquímico mostró expresión de ADAM10 en el citoplasma y en la membrana citoplasmática de las células de la capa basal epidérmica, tanto en células acantolíticas como en células no acantolíticas, a las 12 horas de la inyección con cada una de las tres fracciones de IgG-PV en los ratones. No encontramos tampoco cambios en diferentes tiempos después de la inyección de las fracciones de IgG-PV, siendo similar en cada uno de ellos. Además, se detectó expresión de ADAM10 en el citoplasma y en la membrana citoplasmática en las células de la capa basal epidérmica tras la inyección de IgG-SN, similar a lo observado con IgG-PV1-3 (véase **Tabla 8** y **Fig. 31**).

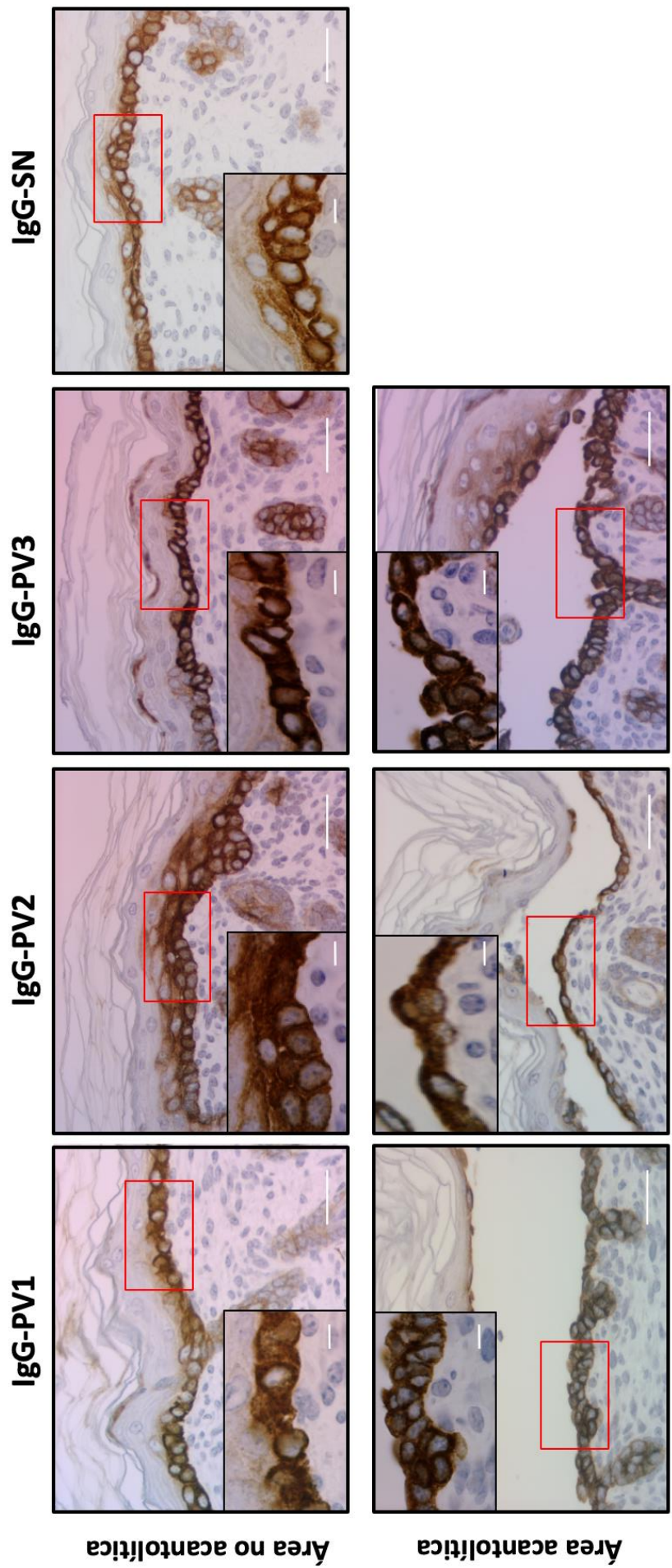


Figura 31: Expresión de ADAM10 proteína tras la administración de IgG PV1-PV3 e IgG-SN en área acantolítica y no acantolítica.

RATONES	Expresión ADAM10 (Patrón citoplasma)	Expresión ADAM10 (Patrón membrana)
SN1	-	-
SN2	-	-
SN3	-	-
PV1a	+	+
PV1b	+	+
PV1c	+	+
PV2a	+	+
PV2b	+	+
PV2c	+	+
PV3a	+	+
PV3b	+	+
PV3c	+	+

Tabla. 8. Resumen de la expresión de ADAM10 en epidermis (células acantolíticas y células no acantolíticas) tras la administración de IgG-PV en los ratones C57. Se detectó expresión (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

Seguidamente, nos planteamos si, a pesar de ser similar la expresión de ADAM10 proteína en la capa basal en cada uno de los supuestos, se producían cambios en la actividad de esta metaloproteasa antes de producirse las lesiones de acantólisis suprabasal. Investigamos la actividad de la ADAM10 mediante un ensayo fluorimétrico en la piel de los ratones, en diferentes momentos después de la inyección de cada una de las fracciones de IgG-PV y de IgG-SN.

La actividad de ADAM10 en los animales tratados con IgG-SN no mostró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo. Sin embargo, la inyección de IgG-PV1 e IgG-PV2 indujo un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) en la actividad de ADAM10, a los 30 y 60 minutos tras la inyección, que fue más destacado con IgG-PV2 (como se ha mencionado en la **Tabla 4**, IgG-PV2 presenta niveles más bajos de anti-Dsg1 y más altos de anti-Dsg3, que IgG-PV1). En contraposición a lo anterior, la administración de IgG-PV3 no produjo un aumento de la actividad de ADAM10 en ningún momento, en las células de la capa basal (véase **Tabla 9** y **Fig. 32A**).

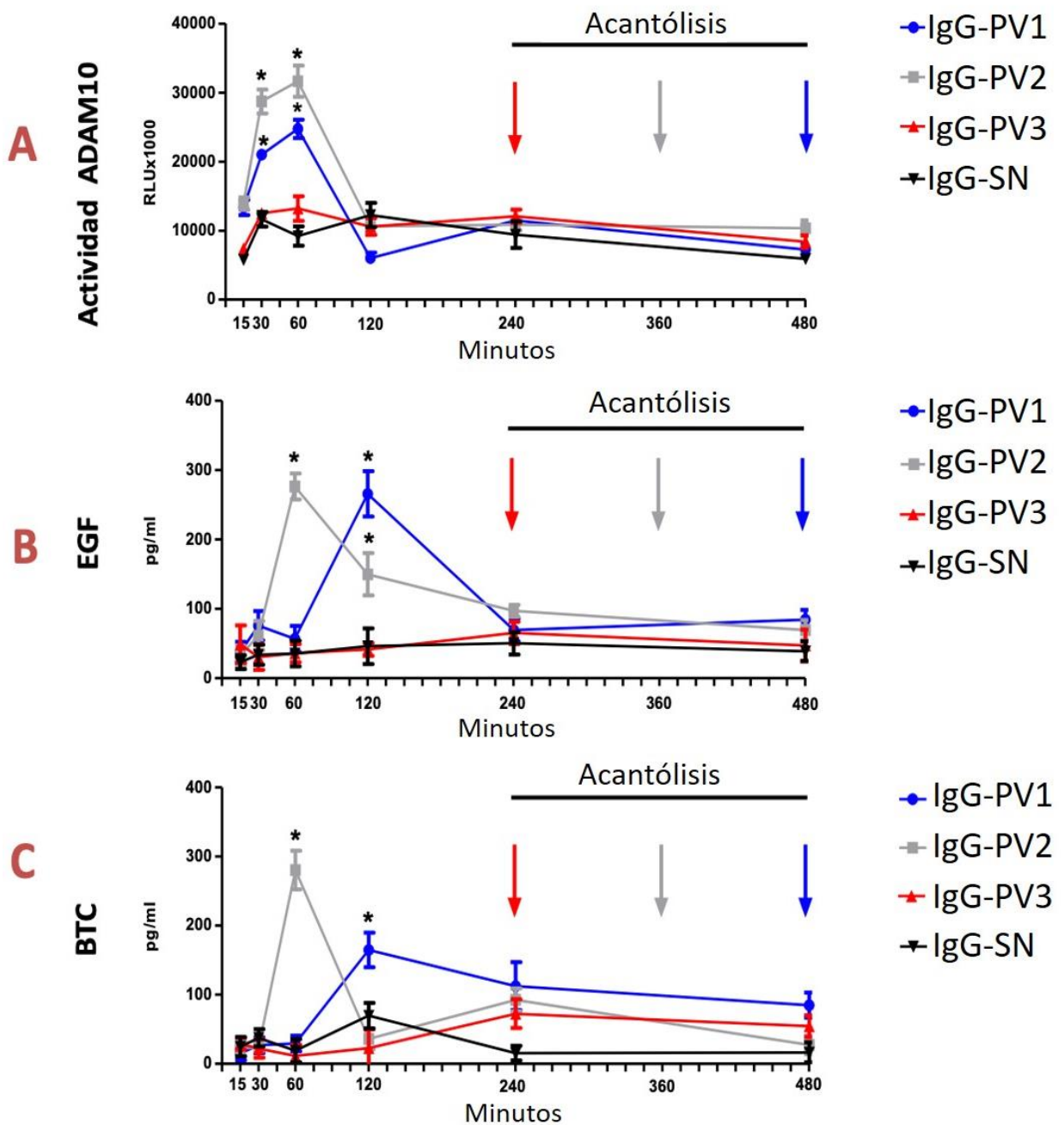


Figura 32: Actividad de ADAM10 y liberación EGF y de BTC antes de la acantólisis. Actividad de ADAM10 (a) y niveles de EGF (b) y de BTC (c) medidos en homogeneizados de piel obtenidos del área de inyección, tras la administración de fracciones de IgG-PV1-3 e IgG-SN a ratones que fueron sacrificados en diferentes tiempos. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran como la media \pm SD (n = 3 por grupo). RLU: unidades relativas de luz. *p < 0,001.

Así pues, pudimos observar un incremento precoz de la actividad de ADAM10, entre 30-60 minutos, con una intensidad posiblemente relacionada con un nivel mayor de Ac anti-Dsg3. La administración de IgG-PV3 con Ac anti-Dsc o IgG-SN anuló este efecto (véase **Fig. 32A**).

RATONES	Incremento máximo de la actividad de ADAM10
SN1	-
SN2	-
SN3	-
PV1a	incremento a los 30 y 60 minutos
PV1b	incremento a los 30 y 60 minutos
PV1c	incremento a los 30 y 60 minutos
PV2a	incremento a los 30 y 60 minutos
PV2b	incremento a los 30 y 60 minutos
PV2c	incremento a los 30 y 60 minutos
PV3a	-
PV3b	-
PV3c	-

Tabla 9. Resumen de la actividad de ADAM10 tras la administración de IgG-SN e IgG-PV en los ratones C57. Tras la administración de IgG-PV3 e IgG-SN no se detectó incremento de la actividad de ADAM10 (-). [n=3 para cada IgG-PV].

(Por otro lado, la inyección de IgG-PV3 tras la inmunoadsorción parcial de anti-Dsc3, o la inyección de IgG- PV1 + IgG-PV3 (1 mg/g + 1 mg/g) aumentó la actividad de ADAM10 $1,6 \pm 0,26$ y $1,4 \pm 0,15$ veces, respectivamente, al compararlo con IgG-PV3 (véase **Fig. 33**)

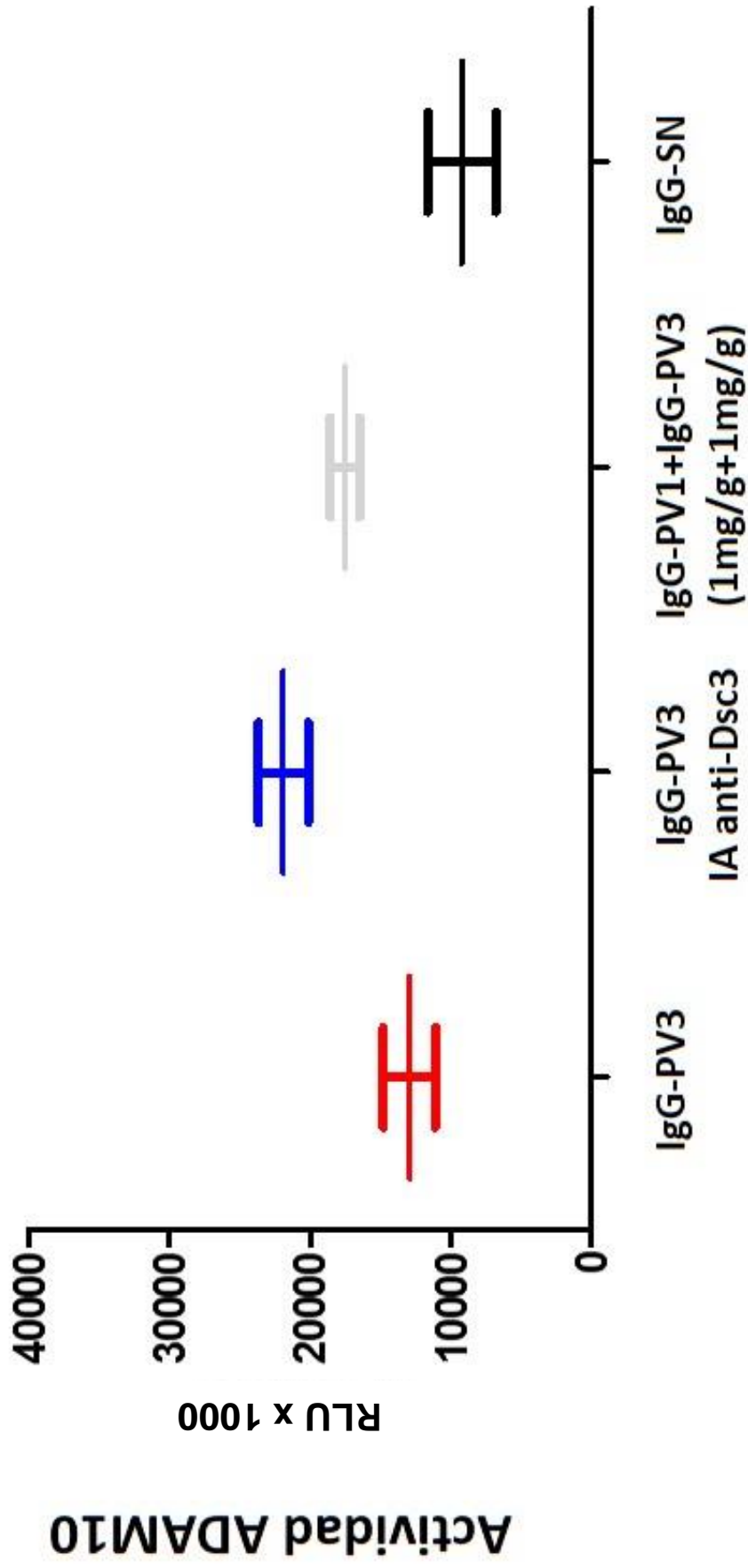


Figura 33: Valores de la actividad de ADAM10 en animales a los que se administró IgG-PV3, IgG-PV3 tras la inmunoadsorción (IA) con proteína de Dsc3, la combinación de IgG-PV1+IgG-PV3 (1m/g+1mg/g) o IgG-SN. RLU: unidades relativas de luz.

4.3. Aumento en la liberación de ligandos de HER, como el EGF y betacelulina, antes de la producción de acantólisis suprabasal, dependiendo del perfil de anticuerpos en los pacientes con pénfigo vulgar.

Es conocido el papel de la ADAM10 en la liberación de los ligandos del EGFR. Además, nuestro hallazgo de un papel relevante de algunos de ellos en las lesiones de PV nos llevó a evaluar estos ligandos en la piel de los ratones, y su posible relación con esta metaloproteasa. Encontramos un aumento altamente ($p < 0.001$) significativo tanto del ligando EGF como de BTC a los 120 minutos de la inyección de IgG-PV1 en los ratones.

La inyección de IgG-PV2 también indujo un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) de estos mismos ligandos, pero más precozmente, a los 60 minutos, un hallazgo consistente con la mayor actividad de ADAM10 mostrada por esta fracción de IgG-PV (tal y como se mostró previamente).

En ambos casos, el aumento de los ligandos de EGFR tuvo lugar cuando la actividad de ADAM10 mostró el valor más alto, antes de detectarse la acantólisis histológica. Los niveles de EGF y de BTC no aumentaron tras la administración de IgG-PV3 ni tras la administración de IgG-SN (véase **Tabla 10** y **Figs. 32B y 32C**).

Por tanto, nuestro estudio demuestra que el aumento de la actividad de ADAM10 fue seguido de un incremento en la liberación de ligandos de EGFR. Observamos también una relación entre el momento de este incremento de ligandos y las características del perfil de Ac de cada suero: más precoz si el nivel de anti-Dsg3 era mayor. Al igual que con lo observado en la actividad de ADAM10, la presencia de Ac anti-Dsc en IgG-PV3 no indujo incremento de ligandos de EGFR.

RATONES	Incremento actividad ADAM10	Incremento niveles EGF	Incremento niveles BTC
SN1	-	-	-
SN2	-	-	-
SN3	-	-	-
PV1a	a los 30 y 60 minutos	a los 120 minutos	a los 120 minutos
PV1b	a los 30 y 60 minutos	a los 120 minutos	a los 120 minutos
PV1c	a los 30 y 60 minutos	a los 120 minutos	a los 120 minutos
PV2a	a los 30 y 60 minutos	a los 60 minutos	a los 60 minutos
PV2b	a los 30 y 60 minutos	a los 60 minutos	a los 60 minutos
PV2c	a los 30 y 60 minutos	a los 60 minutos	a los 60 minutos
PV3a	-	-	-
PV3b	-	-	-
PV3c	-	-	-

Tabla 10. Resumen del incremento de la actividad de ADAM10 y de los niveles de los ligandos (EGF y BTC) tras la administración de IgG-SN e IgG-PV en los ratones C57. Se detectó incremento de la actividad o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

4.4. El aumento en la actividad de EGFR antes de la producción de acantólisis es dependiente de la actividad de Src.

El siguiente paso en nuestro estudio fue valorar en qué medida la Src, una quinasa con un papel activo en fases iniciales de la acantólisis del PV, y demostrado un papel por nuestro grupo en esta enfermedad, podía intervenir en la activación del EGFR, un grupo de receptores TK que intervienen en esta enfermedad. La actividad de Src se estudió analizando el grado de fosforilación de dos residuos específicos diferentes sustratos de Src (Src Tyr416, y EGFR Tyr845). Estudios preliminares nos confirmaron que los Ac frente a estos dos residuos producían marcaje adecuado en los sustratos correspondientes (**ver Fig. 34**).

Encontramos la expresión de pSrc (la forma auto-fosforilada en Tyr416) y pEGFR (Tyr845, residuo fosforilado por Src) en las células basales epidérmicas a los 30 y 60 minutos, respectivamente, tras la inyección de IgG-PV1, IgG-PV2 e IgG-PV3 según

se midió por IF. La expresión de pSrc (Tyr416) y de pEGFR (Tyr845) no se pudo detectar tras la inyección de IgG-SN a lo largo del tiempo.

Estos resultados también se confirmaron, observando que la expresión de pSrc (Tyr416) y pEGFR (Tyr845) se evitó en todos los casos cuando los ratones se trataron previamente con el inhibidor de Src (PP1) (véase **Figs. 34a y 34b** y **Tabla 11**). Es decir, nuestros resultados mostraron que la expresión de una forma posiblemente activa de EGFR en nuestro modelo de PV se produce al menos por la fosforilación en su residuo Tyr845 a través de la Src. El efecto inhibitor de PP1 demostró la fosforilación por Src de EGFR.

RATONES	Expresión de pSrc (Tyr416)	Expresión de pSrc (Tyr416) + PP1	Expresión de pEGFR (Tyr845)	Expresión de pEGFR (Tyr845) + PP1
SN1	-	-	-	-
SN2	-	-	-	-
SN3	-	-	-	-
PV1a	+	-	+	-
PV1b	+	-	+	-
PV1c	+	-	+	-
PV2a	+	-	+	-
PV2b	+	-	+	-
PV2c	+	-	+	-
PV3a	+	-	+	-
PV3b	+	-	+	-
PV3c	+	-	+	-

Tabla 11. Resumen de la expresión de la forma activa fosforilada de la Src (pSrc, Tyr416) y del sustrato específico del Src (pEGFR, Tyr845) en las células basales epidérmicas tras la inyección de IgG-PV e IgG-SN en los ratones C57. Repetición del estudio tras pretratar a los ratones con el inhibidor de Src (PP1). Se detectó expresión (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

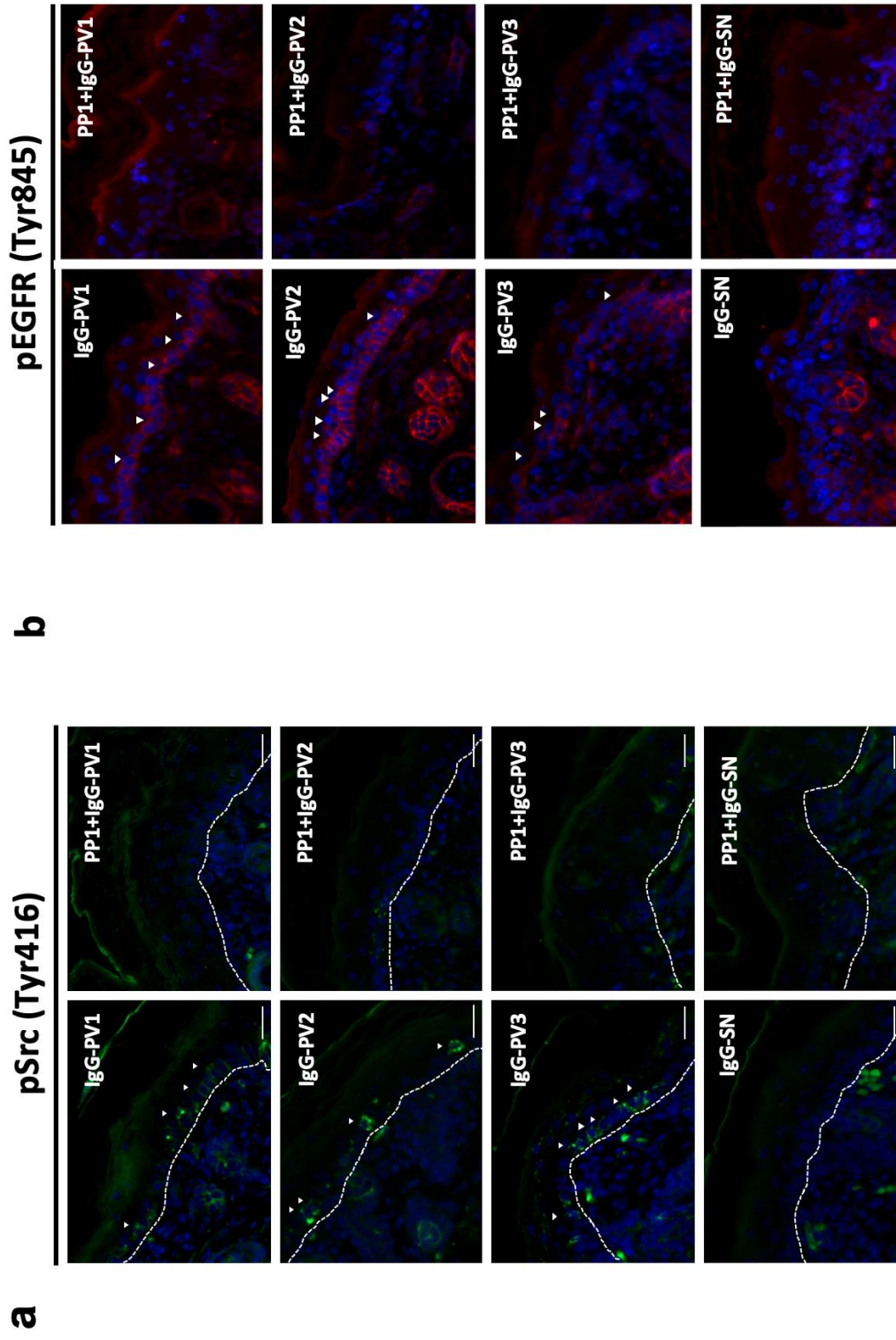


Figura 34: Expresión de la forma fosforilada (p) de Src, p-Src [Tyr416] y la forma fosforilada de EGFR, p-EGFR [Tyr845], detectados por IF a los 30 y 60 minutos respectivamente, tras la administración de fracciones de IgG PV1-3. No se detectó p-Src [Tyr416] ni p-EGFR [Tyr845] tras la administración de IgG-SN, ni tras la administración de IgG PV1-3 en ratones pretratados con el inhibidor de Src (PP1). Las puntas de flecha indican la positividad para p-Src [Tyr416] y p-EGFR [Tyr845].

4.5. La administración de inhibidores de Src y ADAM10 suprime el incremento en la actividad de esta metaloproteasa y de los ligandos de EGFR.

Además de tener la Src una acción directa sobre los receptores TK EGFR en fases precoces del proceso de acantólisis del PV en nuestro modelo, nos planteamos a continuación si la administración de PP1 (inhibidor de Src) podía modular también la actividad de ADAM10 y por tanto impedir la liberación de sus ligandos. A su vez, quisimos saber en qué medida la acción directa sobre la propia actividad de ADAM10 podía controlar la producción de ligandos. Estos dos puntos serían importantes para conocer la interrelación en el eje Src-ADAM10-ligandos de EGFR-EGFR-acantólisis suprabasal.

Cuando se inyectaron los inhibidores de Src (PP1) o ADAM10 (GI254023X) previamente a la administración de IgG-PV1 y IgG-PV2 no se produjo un incremento de la actividad de ADAM10 ni de los niveles de los ligandos EGF y BTC a lo largo del tiempo (véase **Tabla 12**, **Tabla 13** y **Figs. 35 a-c**). Del mismo modo, este incremento no se produjo cuando el experimento se llevó a cabo con IgG-PV3 o IgG-SN.

Nuestros resultados muestran que la liberación de EGF y BTC tiene lugar a través de una vía Src-dependiente de la actividad de ADAM10. Los resultados con IgG-PV3 y IgG-SN fueron idénticos con y sin ambos inhibidores.

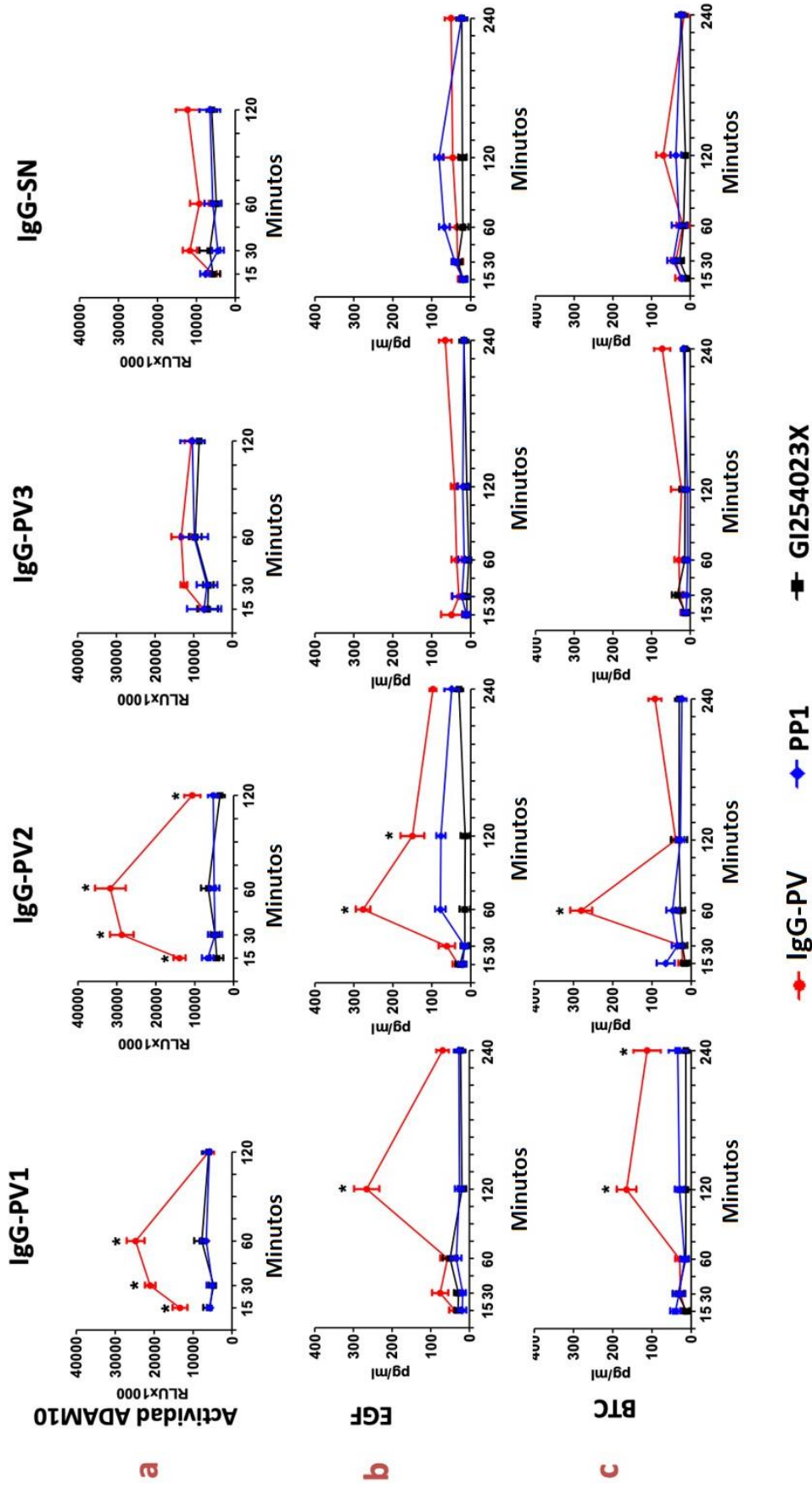


Figura 35: Efecto de los inhibidores sobre la actividad de ADAM10 y sobre la liberación de los ligandos de EGFR y BTC. Actividad de ADAM10 (a) y niveles de EGF (b) y de BTC (c) medidos en homogeneizados de piel obtenidos del área de inyección, tras la administración de fracciones de IgG-PV1-3 o IgG-SN a ratones que fueron sacrificados a los 15, 30 y 60 minutos (hasta 240 minutos en el caso de EGF y BTC). Los experimentos se realizaron tanto con y sin el pretratamiento con inhibidores de Src (PP1) y de ADAM10 (GI254023X). Los resultados de tres experimentos independientes se muestran como la media \pm SD (n = 3 por grupo). RLU: unidades relativas de luz. *p < 0,001.

RATONES	Incremento actividad ADAM10	Incremento niveles EGF	Incremento niveles BTC
PP1 _{PV1.1}	-	-	-
PP1 _{PV1.2}	-	-	-
PP1 _{PV1.3}	-	-	-
PP1 _{PV2.1}	-	-	-
PP1 _{PV2.2}	-	-	-
PP1 _{PV2.3}	-	-	-
PP1 _{PV3.1}	-	-	-
PP1 _{PV3.2}	-	-	-
PP1 _{PV3.3}	-	-	-

Tabla 12. Resumen de la actividad de ADAM10 y de los niveles de los ligandos (EGF y BTC) tras la administración de fracciones de IgG-PV en los ratones C57 pretratados con PP1. Se detectó incremento de la actividad ADAM10 o de los niveles de ligandos (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

RATONES	Incremento actividad ADAM10	Incremento niveles EGF	Incremento niveles BTC
GI254023X PV1.1	-	-	-
GI254023X PV1.2	-	-	-
GI254023X PV1.3	-	-	-
GI254023X PV2.1	-	-	-
GI254023X PV2.2	-	-	-
GI254023X PV2.3	-	-	-
GI254023X PV3.1	-	-	-
GI254023X PV3.2	-	-	-
GI254023X PV3.3	-	-	-

Tabla 13. Resumen de la actividad de ADAM10 y de los niveles de los ligandos (EGF y BTC) tras la administración de fracciones de IgG-PV en los ratones C57 pretratados con GI254023X (inhibidor de ADAM10). Se detectó incremento de la actividad ADAM10 o de los niveles de ligandos (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

4.6. La supresión de la actividad de Src, ADAM10 y EGFR, así como de la unión de EGF a su receptor, anula la acantólisis suprabasal.

Uno de los objetivos más importantes en este estudio fue valorar cómo es la respuesta *in vivo* de los inhibidores de cada una de las moléculas que encontramos con un papel importante en nuestro modelo de PV. Es decir, conocer si finalmente la supresión de cada una de ellas se asociaba a un bloqueo en el mecanismo de acantólisis suprabasal. Para ello observamos los efectos de PP1 (inhibidor de Src), CL 387,785 (inhibidor de EGFR), GI254023X (inhibidor de ADAM10) y Cetuximab [Ctx], inhibidor de ligando EGF).

Cuando a los ratones se les pretrató con cada uno de estos inhibidores, y posteriormente se les inyectó IgG-PV1 y IgG-PV2, no se encontró despegamiento de la piel (Ns) a las 12 horas, ni tampoco presencia de acantólisis suprabasal (véase **Fig.36** y **Tablas 14-17**). Sorprendentemente, ninguno de los inhibidores evitó la separación celular epidérmica (tanto clínica como histológicamente) cuando se administró IgG-PV3 y IgG-SN (véase **Fig. 36**).

Es decir, nuestros resultados demuestran que, en nuestro modelo de estudio, la acción de Src, ADAM10 y de EGFR y sus ligandos es necesaria para que la acantólisis suprabasal se produzca en el PV. Por el contrario, en aquellas fracciones de IgG-PV que contengan Ac nDsg (como los Ac anti-Dsc) y Ac anti-Dsg1 y 3, estas moléculas no intervienen en el PV.

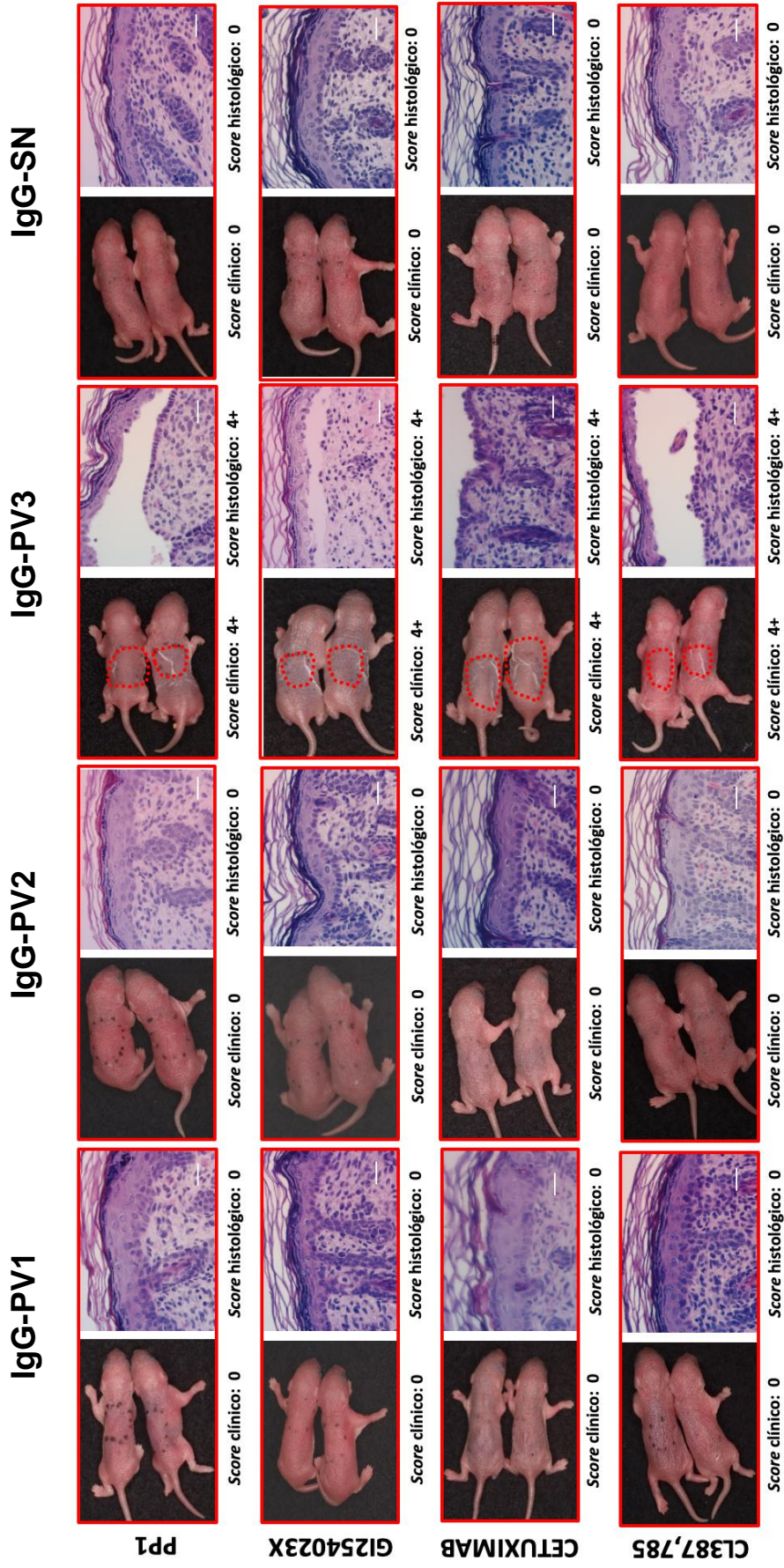


Figura 36: *Score clínico e histológico pasadas 12 horas tras la administración de IgG-PV1-3 o IgG-SN en combinación con los inhibidores.*

RATONES	Enfermedad clínica	Enfermedad histológica
PP1 _{PV1.1}	-	-
PP1 _{PV1.2}	-	-
PP1 _{PV1.3}	-	-
PP1 _{PV2.1}	-	-
PP1 _{PV2.2}	-	-
PP1 _{PV2.3}	-	-
PP1 _{PV3.1}	+	+
PP1 _{PV3.2}	+	+
PP1 _{PV3.3}	+	+

Tabla 14. Resumen de los hallazgos clínicos e histológicos tras la administración de fracciones de IgG-PV en los ratones C57, pretratados con el inhibidor de Src (PP1). Se detectó enfermedad clínica/histológica (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

RATONES	Enfermedad clínica	Enfermedad histológica
GI254023X _{PV1.1}	-	-
GI254023X _{PV1.2}	-	-
GI254023X _{PV1.3}	-	-
GI254023X _{PV2.1}	-	-
GI254023X _{PV2.2}	-	-
GI254023X _{PV2.3}	-	-
GI254023X _{PV3.1}	+	+
GI254023X _{PV3.2}	+	+
GI254023X _{PV3.3}	+	+

Tabla 15. Resumen de los hallazgos clínicos e histológicos tras la administración de fracciones de IgG-PV en los ratones C57, pretratados con GI254023X (inhibidor de ADAM10). Se detectó enfermedad clínica/histológica (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

RATONES	Enfermedad clínica	Enfermedad histológica
CL 387,785 _{PV1.1}	-	-
CL 387,785 _{PV1.2}	-	-
CL 387,785 _{PV1.3}	-	-
CL 387,785 _{PV2.1}	-	-
CL 387,785 _{PV2.2}	-	-
CL 387,785 _{PV2.3}	-	-
CL 387,785 _{PV3.1}	+	+
CL 387,785 _{PV3.2}	+	+
CL 387,785 _{PV3.3}	+	+

Tabla 16. Resumen de los hallazgos clínicos e histológicos tras la administración de fracciones de IgG-PV en los ratones C57, pretratados con CL 387,785 (inhibidor del EGFR). Se detectó enfermedad clínica/histológica (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

RATONES	Enfermedad clínica	Enfermedad histológica
Ctx _{PV1.1}	-	-
Ctx _{PV1.2}	-	-
Ctx _{PV1.3}	-	-
Ctx _{PV2.1}	-	-
Ctx _{PV2.2}	-	-
Ctx _{PV2.3}	-	-
Ctx _{PV3.1}	+	+
Ctx _{PV3.2}	+	+
Ctx _{PV3.3}	+	+

Tabla 17. Resumen de los hallazgos clínicos e histológicos tras la administración de fracciones de IgG-PV en los ratones C57, pretratados con Ctx (Ac monoclonal que bloquea la unión de EGF a EGFR). Se detectó enfermedad clínica/histológica (+) o no se detectó (-). [n=3 para cada IgG-PV].

4.7. La disminución progresiva de los niveles de los anticuerpos anti-desmocolina 3 restablece la actividad de ADAM10.

De los datos obtenidos hasta ahora, se observa que, en el PV, cuando se trabaja con fracciones de PV que contienen Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3, se evidencia la activación de vías de señalización intracelular que implican de forma precoz a la Src, ADAM10 y sus ligandos, así como al EGFR. Estas moléculas tienen un tiempo de actuación que

hace que la separación de los queratinocitos se produzca en un periodo de tiempo concreto. A su vez, hemos visto como dependiendo de los niveles de anti-Dsg3, la inducción de estas vías se produce con una intensidad mayor o menor. Pero a su vez, hemos visto también que en el caso de realizar los estudios con fracciones de IgG-PV que contengan además Ac nDsg, como anti-Dsc, los resultados son diferentes: se produce también acantólisis suprabasal, pero la intensidad de esta es mayor, se produce en un periodo de tiempo más corto y activa un patrón de enzimas diferente.

Ante este escenario, nos preguntamos qué ocurriría con esas fracciones de IgG-PV con Ac nDsg, si disminuyésemos la cantidad en sangre de anti-Dsc, y dejásemos el resto de Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3 actuar en los ratones una vez inyectados. Para evaluar este objetivo, lo llevamos a cabo de dos maneras. Por una parte, administrando a los ratones fracciones de IgG-PV consistente en IgG-PV2 + IgG-PV3 que conservase la cantidad total idéntica de IgG administrada (2mg/gr de peso de ratón), pero disminuyendo la cantidad de anti-Dsc (cantidades decrecientes de la fracción IgG-PV3). Y por otra, realizando inmunoadsorción de Ac anti-Dsc3 de IgG-PV3 e inyectando en los ratones la fracción resultante.

Tal y como se observa en la **Figura 30**, cuando a los ratones se les inyectó IgG-PV2 + IgG-PV3 en diferentes proporciones (que contenían niveles similares de autoAc anti-Dsg3, pero usando una cantidad menor de autoAc anti-Dsc2/3 en cada inyección), el grado de la acantólisis suprabasal fue progresivamente menor. Se obtuvieron resultados similares con y sin inhibición de ADAM10 (véase **Fig. 30**). Es decir, con la fracción IgG-PV3 *wild*, el despegamiento epidérmico fue muy intenso y precoz, y la acantólisis muy exagerada, tal y como se comentó. En cambio, la disminución progresiva de anti-Dsc2/3 en las fracciones decrecientes de IgG-PV3 hizo que los resultados clínicos e histológicos de los ratones fuesen progresivamente menores, asemejándose más a aquellos encontrados con IgG-PV2.

Estos datos muestran que cuando en el suero disminuye la cantidad de Ac anti-Dsc3 la acción de la fracción IgG-PV inyectada se va asemejando más a la fracción IgG-PV sin estos Ac. No obstante, basta que exista unos niveles todavía en la fracción inyectada para que su efecto sobre la ADAM10 no se elimine por completo con la administración de su inhibidor.

5. DISCUSIÓN

La descripción de acantólisis suprabasal por Lever en 1953 en un grupo de pacientes con lesiones en piel y mucosas, permitió definir e individualizar al PV como una enfermedad ampollosa que debía separarse de otras similares, como era el penfigoide ampolloso (Lever, 1953). A esta descripción morfológica se sumaron, unos años después, los trabajos de Beutner y Jordon, encontrando depósitos de IgG en los queratinocitos de las lesiones cutáneas y mucosas en las biopsias de los pacientes con PV (Beutner and Jordon, 1964; Beutner *et al.*, 1965; Beutner, Rhodes and Holborow, 1967; Beutner, Jordon and Chorzelski, 1968). Es decir, desde el punto de vista patogénico se pudo pasar de una mera descripción histológica a una explicación inmunológica de la enfermedad. Este fue el punto de partida para considerar al PV dentro de lo que posteriormente serían las enfermedades ampollosas autoinmunes. Esta concepción inmunológica se reforzó al observar que podía reproducirse la enfermedad en ratones, al administrarles IgG procedentes de pacientes con PV (Anhalt *et al.*, 1982). En los años 90 se dio un salto cualitativo en los conocimientos de esta enfermedad al describir la Dsg3 (cadherina constitutiva de los desmosomas de la epidermis de la piel y mucosas, entre otros tejidos) como el Ag al que se unían los Ac IgG circulantes que se habían descrito en los pacientes (Amagai, Klaus-Kovtun and Stanley, 1991; Kárpáti *et al.*, 1993)

Conceptualmente, la interacción de la Dsg3 y los autoAc IgG ha permanecido como el argumento más importante para explicar la patogenia del PV durante muchos años, y ha sido la columna vertebral sobre la que ha descansado el tratamiento de estos pacientes. Sin embargo, como hemos detallado en la Introducción, las importantes descripciones de los últimos 20 años han permitido clarificar que la respuesta encontrada en el PV es mucho más complicada que una simple respuesta humoral tipo IgG frente a un único Ag (Dsg3) de la epidermis. Y que, además, en los queratinocitos a los que se unen estos autoAc se activan múltiples vías de señalización y mecanismos moleculares, que terminan finalmente por separar las células entre sí (acantólisis).

Hace ya 25 años iniciamos en nuestro grupo el estudio de los mecanismos que actúan en la acantólisis del PV, usando un modelo murino de esta enfermedad. Parte de estos resultados de forma resumida se agrupan en cuatro puntos:

- Se activan vías de señalización intracelular en los queratinocitos después de unirse la IgG a la membrana, implicando a la Src, a la fosfolipasa C (PLC), y a los niveles de calcio en la célula. La administración de inhibidores específicos de estas moléculas anula la acantólisis (Sánchez-Carpintero *et al.*, 2004).
- Durante la acantólisis del PV se activan importantes mecanismos de oxidación por liberación de moléculas que contribuyen a dañar las membranas de los queratinocitos acantolíticos una vez se une la IgG a sus Ag. Una de estas moléculas liberadas es la óxido-nítrico-sintasa (NOS), teniendo un papel más relevante la isoforma neural (nNOS) (Marquina M *et al.*, 2008).
- En la acantólisis observada en el PV coinciden varias vías intracelulares que terminan produciendo la separación entre los queratinocitos. Una de estas vías es la vía de las caspasas, induciendo mecanismos apoptóticos (Pelacho B *et al.*, 2004).
- Entre las vías que se activan en el PV, además, destaca la vía de las HER (EGFR y otras isoformas), con producción de varios de sus ligandos, y activación también de moléculas como mTOR, (Pretel *et al.*, 2009) o la FAK, entre otras (Gil *et al.*, 2012).

Muchos de estos hallazgos han sido un punto de partida para iniciar este nuevo proyecto, teniendo en cuenta también los resultados de otros grupos. Todos estos conocimientos nos han permitido plantearnos la hipótesis de que en el PV se produce acantólisis suprabasal en todos los casos, pero, probablemente, dependiendo del perfil de autoAc en cada paciente los mecanismos acantolíticos serán distintos. A su vez, nos planteamos que estas diferencias en el perfil de Ac de cada paciente puedan dar lugar a distintos fenotipos clínicos de PV.

A continuación, iremos comentando y discutiendo los puntos más importantes de los resultados encontrados en nuestro estudio, contrastándolos con los datos encontrados por otros grupos. Finalmente haremos una propuesta patogénica basado en los resultados que hemos encontrado en nuestro estudio.

1. El tiempo de aparición de la acantólisis suprabasal y su intensidad en el PV varía en función del perfil de anticuerpos en cada paciente y de sus niveles circulantes.

En los pacientes con esta enfermedad se desencadena una respuesta humoral frente a la Dsg3, ocasionando lesiones en mucosa oral en la mayoría de los casos, y casi la mitad de los pacientes presentan también lesiones cutáneas, con una mayor o menor extensión. Tras la descripción de la Dsg3 como el Ag más importante del PV (Amagai, Klaus-Kovtun and Stanley, 1991; Kárpáti *et al.*, 1993), se dio un paso importante, confirmando que la diferencia en el fenotipo PVcm o PVm se asociaba a un perfil de autoAc distintos (Ding *et al.*, 1997). Así, se observó que cuando los pacientes desarrollaban solamente una respuesta humoral IgG mayoritariamente frente a la Dsg3, se encontraban lesiones en mucosas, principalmente en mucosa oral. En cambio, si se asociaba además una respuesta frente a la Dsg1, los enfermos desarrollaban también lesiones en la superficie cutánea. En ambos casos se producía acantólisis suprabasal en la epidermis. Esta fue la primera respuesta para explicar diferentes formas clínicas de PV en los pacientes, quizá por un perfil de autoAc diferentes. No obstante, ¿cómo era posible que, con un perfil de autoAc distinto, se desarrolle el mismo patrón histológico, y que la sola presencia adicional de un autoAc cambie el fenotipo clínico en cada paciente?

Un hallazgo interesante en el PV es la correlación entre los niveles de Ac anti-Dsg1/3 y las lesiones activas de enfermedad en la mayoría de los pacientes (Živanović *et al.*, 2017). En este principio se fundamenta parte del tratamiento en los pacientes con PV, y la disminución de estos Ac en sangre se considera un criterio de respuesta terapéutica.

Un estudio que muestra la relación entre el perfil de autoAc y el fenotipo de PV en cada paciente ha sido publicado recientemente (Ujii *et al.*, 2019). Los autores demuestran que en pacientes con PVcm, y con presencia de autoAc anti-Dsg3 y anti-Dsg1, pueden recidivar después de unos meses de tratamiento y remisión del cuadro clínico, bien como PVcm nuevamente, o con un fenotipo de PVm y en estos casos solo presentarán autoAc frente a la Dsg3, desapareciendo los autoAc anti-Dsg1.

Sin embargo, si bien es aceptado que el perfil de Ac puede definir el fenotipo clínico de cada paciente con PV (Spindler and Waschke, 2018), realmente lo que puede definir el tipo de PVcm en cada paciente son las vías de señalización intracelular que activan -o no activan- esos Ac (Walter *et al.*, 2017). Y esto es así porque en ocasiones no existe un paralelismo completo entre los niveles de Ac en un paciente con PV en fase activa y sus niveles en fase de remisión: pueden persistir niveles elevados de anti-Dsg3 a pesar de no mostrar lesiones activas de PV (Öktem *et al.*, 2018). Estos hallazgos, además de los comentados en la Introducción, han llevado a realzar el papel que pueden tener otros Ac en pacientes con PV (como son los Ac nDsg) que hasta ahora no se conocían con profundidad, y que además siguen sin ser una determinación habitual mediante técnicas de ELISA en estos pacientes.

Todos estos datos pueden ayudarnos a dar una primera explicación a los hallazgos observados en nuestro estudio.

Por una parte, observamos un periodo de tiempo de acantólisis más corto en los ratones a los que administramos IgG-PV con niveles más elevados de anti-Dsg3. No obstante, el grado de intensidad de acantólisis y de afectación clínica en los ratones terminó siendo similar después de administrar IgG-PV1 y IgG-PV2. La relación entre el grado de intensidad en la acantólisis suprabasal y el perfil de Ac en los pacientes con PV no queda clara en la literatura, pero a la luz de los estudios publicados, nuestros hallazgos podrían realzar el papel de los Ac anti-Dsg3 en esas fracciones de IgG-PV.

Otro hallazgo relevante en nuestro estudio fue el hecho de encontrar acantólisis suprabasal mucho más precoz (la mitad de tiempo) y mucho más intensa, cuando administramos IgG-PV3, una fracción de IgG-PV que, a diferencia de las otras dos, presentaba Ac anti-Dsc. No se han estudiado en profundidad los mecanismos de este tipo de Ac, ni cómo es la clínica que muestran pacientes con Ac anti-Dsc. También se desconoce si el fenotipo clínico que adoptan los pacientes es el mismo cuando están presentes solamente los Ac anti-Dsc o si se asocian con Ac anti-Dsg1/3, como era en nuestro paciente. Este es un punto importante para entender variantes fenotípicas en el PV. La única aproximación que está descrita, aunque de forma aislada en algún paciente, es la presencia de formas clínicas más severas de PV cuando asocian los pacientes ambos tipos de Ac anti-Dsg y anti-Dsc (Makino *et al.*, 2015; Kamiya *et al.*,

2016). La razón por la que la adición de un Ac frente a otra proteína de adhesión desmosómica presenta estas variaciones clínicas, aunque finalmente termine también en el mismo patrón histológico (acantólisis suprabasal), no es completamente conocido.

2. La metaloproteasa ADAM10 se expresa en la capa basal de la epidermis e incrementa su actividad tras la inyección de fracciones IgG de los pacientes con pénfigo vulgar, dependiendo del perfil de anticuerpos circulantes.

Uno de los hallazgos más fascinantes en el PV es la selectividad de la acantólisis suprabasal, produciéndose exactamente por encima de la capa basal: dejando este estrato en el suelo de la ampolla, y quedando el resto de la epidermis en el techo.

Esta selectividad se ha intentado explicar por la distribución selectiva de la Dsg1 y Dsg3 en la piel y en las mucosas (teoría compensatoria) (Mahoney *et al.*, 1999). Sin embargo, en los últimos años nuevas evidencias confirman que existen otros mecanismos asociados además de la diferente distribución de estas cadherinas en la epidermis (Sinha and Sajda, 2018; Sajda and Sinha, 2018; Pollmann *et al.*, 2018)

La capa basal de la epidermis es el estrato germinativo de la epidermis (Yousef, Alhadj and Sharma, 2019). La multiplicación de las células de este estrato permite mantener un ciclo de división celular permanente, a la vez que las células salen de este compartimento y empiezan el proceso de maduración y especialización, hasta llegar en el plazo de 2-3 semanas a la capa más superficial de la epidermis (Sun, Fu and Sheng, 2007). En este proceso de maduración suprabasal se van añadiendo marcadores celulares específicos, o dejan de producirse en su interior moléculas que activan selectivamente, de forma fisiológica, vías de señalización que intervienen en la adhesión celular/desunión celular para permitir la migración de los queratinocitos a estratos más altos. De hecho, el PV es considerado por algunos como un proceso que magnifica este proceso de forma exagerada.

Así, se ha observado que muchas de las moléculas que intervienen en la acantólisis suprabasal del PV, se expresan en su forma activa en la capa basal de la epidermis y pueden por eso producir un proceso selectivo en este estrato de la epidermis. Se

encuentra una expresión en la capa basal de la epidermis de FAK (Gil *et al.*, 2012), nNOS (Marquina *et al.*, 2008), mTOR (Pretel *et al.*, 2009) EGFR y sus isoformas HER (Pretel *et al.*, 2009), Src (Pretel *et al.*, 2009), entre otras moléculas que intervienen en la acantólisis suprabasal. Así pues, parte de la selectividad de la desunión entre los queratinocitos en esta enfermedad (acantólisis), se puede deber, en una parte importante, a que solo en la capa basal se expresan en su forma activa los sistemas que fisiológicamente intervienen en la separación entre las células de la epidermis.

Basados en estos conceptos, buscamos si la expresión de la ADAM10 tenía también un papel relevante en la acantólisis suprabasal operada en esta enfermedad, y su presencia también en la capa basal lo podría favorecer. Partíamos de varias premisas. Por una parte, su papel fisiológico como metaloproteasa en la liberación de ligandos para el EGFR y otras isoformas HER localizadas normalmente en la capa basal (Duffy *et al.*, 2011; Sahin *et al.*, 2004; Edwards, Handsley and Pennington, 2009); la acción relevante de EGF y BTC (Pretel *et al.*, 2009), dos ligandos de estos receptores TK, y también implicados en esta enfermedad (Pretel *et al.*, 2009); (Waschke and Spindler, 2014; Al-Jassar *et al.*, 2013; Bektas *et al.*, 2013); la expresión de EGFR junto a los desmosomas en condiciones normales (Yin *et al.*, 2005; Lorch *et al.*, 2004) y la localización de ADAM10 en capa basal de la epidermis, junto a las uniones intercelulares (Wild-Bode *et al.*, 2006).

Encontramos que la expresión de ADAM10 tenía un marcaje selectivo en la capa basal de la epidermis, tanto en las células acantolíticas como no acantolíticas, tras la inyección de IgG-PV a los ratones. Este hecho no nos permitía saber el papel real en el PV al encontrarse esta metaloproteasa expresada de forma constitutiva en la capa basal de la epidermis (Scholz *et al.*, 2007), quizá por su acción fisiológica en este estrato epidérmico, como hemos comentado. Es por este motivo por lo que buscamos si se producía un aumento de su actividad en nuestro modelo murino de PV.

Encontramos varios hechos interesantes, no descritos hasta ahora en el PV. Por una parte, un incremento progresivo de la actividad de esta metaloproteasa a partir de los 15 minutos, que incrementó a los 30 minutos y se hizo máximo a la hora después de la administración de la fracción IgG-PV1 y IgG-PV2. En segundo lugar, un incremento de la actividad de ADAM10 que fue proporcionalmente mayor en la

fracción de IgG-PV que presentaba niveles más elevados de anti-Dsg3 (IgG-PV2). Este hecho estuvo relacionado con lo comentado en el punto 1), de una acantólisis más precoz, también con IgG-PV2. Es decir, observamos una relación entre los niveles más elevados de anti-Dsg3, una acantólisis más precoz y una actividad más elevada de ADAM10. Hoy en día no sabemos cómo puede explicarse este hecho. Quizá, al existir una relación entre el perfil de Ac en los pacientes, y la activación selectiva de ciertas vías de señalización (Walter *et al.*, 2017), puede existir una conexión entre los Ac anti-Dsg3 y la activación de ADAM10. De forma interesante, pudimos observar que el aumento de la actividad de ADAM10 antecedió a la aparición de acantólisis suprabasal con IgG-PV1 e IgG-PV2 (8 horas y 6 horas respectivamente), lo que podía poner en conexión ambos sucesos. Y, en tercer lugar, encontramos que el incremento de la actividad de ADAM10 no se produjo cuando la fracción IgG-PV inyectada en los ratones presentaba Ac anti-Dsg1/3 y además Ac anti-Dsc3 (IgG-PV3). Los resultados encontrados en esos ratones fueron los mismos que los observados con IgG-SN: es decir, una ausencia en el incremento de la actividad de esta metaloproteasa. Esto podría significar que algunos sueros de pacientes con PV que contienen Ac anti-Dsc3 [hasta el 44% de los pacientes con PV (Kalantari-Dehaghi, Anhalt, *et al.*, 2013)] podrían activar vías de señalización distintas en estos casos -sin implicar a ADAM10-, produciendo una acantólisis más severa y mucho más precoz, y producir también acantólisis suprabasal.

3. Aumento en la liberación de ligandos de HER, como EGF y betacelulina, antes de la producción de acantólisis suprabasal, dependiendo del perfil de anticuerpos en los pacientes con pénfigo vulgar.

El siguiente punto que nos planteamos en el estudio fue valorar si el incremento de la actividad de la ADAM10 encontrado en el PV estaba asociado a la liberación de ligandos de HER, favoreciendo así la acantólisis suprabasal. Estudios previos de nuestro grupo ya habían demostrado que tras la inyección a los ratones de fracciones IgG-PV, se detectaba un incremento de EGF y BTC a las 12 horas (Pretel *et al.*, 2009). Ahora deseábamos conocer si ambos hallazgos estaban relacionados, y

también nos preguntamos si el incremento de estos ligandos era también precoz desde la inyección a los ratones de IgG-PV, y si existía una relación en el tiempo entre su liberación progresiva tras el incremento de la actividad de ADAM10.

Como ha sido comentado más arriba, la familia ADAM ejerce su función en múltiples sistemas celulares, tanto de forma fisiológica como patológica (Edwards, Handsley and Pennington, 2009; Wetzel, Seipold and Saftig, 2017). Además, los dos ligandos de HER que encontramos implicados en el PV están liberados de forma selectiva por ADAM10 (Duffy *et al.*, 2011; Sahin *et al.*, 2004). Así pues, estos hallazgos nos llevaron a valorar la posible relación existente entre nuestros resultados y aquellos referidos en la literatura.

Tal y como habíamos sospechado, los niveles de EGF y BTC empezaron a aumentar poco después de que se iniciara el incremento de la actividad de ADAM10: ésta fue máxima a los 30 y 60 minutos, y mayor para IgG-PV2 que para IgG-PV1 (el primero con niveles mayores de Ac anti-Dsg3). Los niveles de EFG y BTC fueron máximos a los 60 minutos para IgG-PV2, y un poco después (a los 120 minutos) para IgG-PV1. Sin embargo, cuando administramos a los ratones fracciones de IgG-PV con Ac anti-Dsg y anti-Dsc3 (como era IgG-PV3), no se incrementaron los ligandos de HER. Estos hallazgos estuvieron también relacionados con la ausencia de un incremento de actividad de ADAM10 con esta misma fracción IgG-PV3. Por tanto, se ponía en relación la presencia de un incremento de ADAM10 con el incremento también de ligandos de HER.

Fue interesante encontrar que el periodo de tiempo entre el estímulo (IgG-PV) y la liberación de ligandos (EFG y BTC) (60-120 minutos) fue similar al observado en otros sistemas celulares (Sahin *et al.*, 2004), incrementándose la liberación de ligandos HER también a los 60 minutos. Por tanto, también en el PV podría existir una acción de la ADAM10 en el PV, mediada a través de la liberación de ligandos específicos.

No sabemos con certeza la razón por la que IgG-PV1 mostró un retraso en el incremento de EFG y BTC en nuestro estudio. Esta misma fracción, como se ha comentado, también mostró un incremento algo menor de actividad de ADAM10, respecto a IgG-PV2. La única diferencia entre estas dos fracciones fue en una menor cantidad de Ac anti-Dsg3-en IgG-PV1. Este aspecto no está estudiado en la literatura.

Existen modelos que pueden modular e inhibir la liberación de ligandos de HER, pero en cambio no está bien estudiado como se puede retrasar (Horiuchi *et al.*, 2007; Mendelson *et al.*, 2010).

En nuestro estudio previo (Pretel *et al.*, 2009), además de observar la liberación de EFG y BTC, observamos también un incremento TGF- β , pero no de anfiregulina ni de neuroregulina en las lesiones de PV. El primero y el segundo liberados por ADAM17 (Duffy *et al.*, 2011; Huovila *et al.*, 2005), y el tercero por ADAM10 (Huovila *et al.*, 2005; Vullhorst and Buonanno, 2019). De momento no podemos saber si existen otras isoformas de ADAM implicadas en la acantólisis suprabasal del PV, y si otros ligandos también contribuirían en este proceso (epiregulina, *heparin-binding EGF*, entre otros), pero nuestros estudios preliminares apuntan que quizá, en esta enfermedad, el sistema ADAM-ligandos de HER puede activarse de una forma más amplia. Además, queda por saber también si la ADAM10 y otras isoformas de ADAM podrían “liberar” también otras moléculas o proteínas de la membrana celular, distintas de EFG y BTC, actuando también en los receptores TK HER o en otros receptores, o mediando su acción en otras cadherinas, o a través de moléculas de adhesión o citocinas proinflamatorias (FasL, cadherinas E y N, HER2, CD30, CD23, IL-6R,...) (Crawford *et al.*, 2009; Franzke, Bruckner-Tuderman and Blobel, 2009).

En nuestro estudio no encontramos un incremento de ligandos EGF y BTC después de la administración de la fracción IgG-PV3. Este hallazgo estuvo acompañado de una ausencia también en el incremento de la actividad de ADAM10. Esta fracción, a diferencia de IgG-PV1 y IgG-PV2, presentaba Ac anti-Dsc3 además de anti-Dsg1 y anti-Dsg3. Estos hallazgos plantean la cuestión de si, dependiendo del perfil de Ac en un paciente, se activan unas vías de señalización intracelular u otras (Walter *et al.*, 2017). Y de si ésta es una característica de cada perfil de Ac en cada paciente, o también de si este hecho está también en relación con la observación de un fenotipo de PV diferente, como ocurrió en los ratones a los que se le inyectó IgG-PV3, con un tiempo para la acantólisis suprabasal menor y más severa, y también un despegamiento de la epidermis más intenso.

Así pues, el estudio de actividad de ADAM10 y de los ligandos de HER liberados tras emplear diferentes fracciones de IgG-PV en nuestro modelo murino, muestra que quizá existen unos patrones de señalización intracelular, dependiente del perfil de

Ac en cada caso, pero marcados por la activación o no de esta metaloproteasa, y de los ligandos liberados por ella.

4. El aumento en la fosforilación de EGFR antes de la producción de acantólisis es dependiente de la actividad de Src.

Si se produce un aumento en la actividad de ADAM10 y se liberan ligandos de HER, sería importante conocer qué mecanismos regulan esta actividad cuando se administra IgG-PV a los ratones e inducen acantólisis suprabasal. Este punto es fundamental a la hora de establecer estas moléculas como posibles dianas terapéuticas.

Un estudio de nuestro grupo confirmó que la Src (Pretel *et al.*, 2009) es una molécula con un papel relevante en la acantólisis suprabasal, activándose a través de Ac anti-Dsg3 (Walter *et al.*, 2017) y que la administración de inhibidores de esta TK anulaba la enfermedad en los ratones (Sánchez-Carpintero *et al.*, 2004). Varios estudios posteriores confirmaron estos hallazgos (Chernyavsky *et al.*, 2007b; Heupel *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2017; Kugelmann *et al.*, 2019).

La Src en el PV puede mostrar múltiples acciones. En condiciones normales, esta TK está asentada en las uniones adherentes (Tsukita *et al.*, 1991), y es clave para estabilizar las cadherinas implicadas en las uniones entre las células (Owens *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2010). Tras la administración de IgG-PV se observa fosforilación de placofilina 3 y translocación de Dsg3, todo ello dependiente de Src (Cirillo *et al.*, 2014), mostrando un papel relevante en el ensamblaje de los desmosomas (Rötzer *et al.*, 2014; Rötzer *et al.*, 2015).

Además, es conocido que proteína-quinasa como las quinasas de la familia Src, pueden fosforilar al EGFR en el residuo Tyr845, activando este receptor y permitiendo que se pongan en marcha diferentes vías intracelulares (ver Introducción) (Haas *et al.*, 2002; Sato, 2013). Por otra parte, la Src sufre un proceso de autofosforilación en Tyr416 antes de experimentar una activación en su función (Yoon, Choi and Lee, 2018). Así pues, esta conexión Src-EGFR se podría postular como un punto clave en el mecanismo de acantólisis, y permitiría establecer un papel relevante de la Src al incrementar la actividad de ADAM10 (tal y como hemos

visto en los resultados) la cual es necesaria para liberar ligandos de EGFR y de otras isoformas de HER.

Basados en los resultados anteriores, Chernyavsky y cols. (Chernyavsky et al., 2007b) encontraron que tras la administración de IgG-PV se producía un incremento de Src a los 30 minutos, y de EGFR a los 60 minutos. Es decir, se observaba que el aumento de Src era previo. Establecieron que el eje Src/EGFR tendría un papel importante en los mecanismos de acantólisis del PV.

Además, se ha descrito que EGFR y las isoformas HER pueden ser activadas (fosforiladas en Tyr845) de forma dependiente o independiente de ligandos (Hackel *et al.*, 1999). Estos postulados, concretándolos en el caso del PV, y ante los resultados aportados, significan que: EGFR podría ser activado, entre otros, por la Src y, además, por la acción de ligandos liberados previamente por las metaloproteasas ADAMs.

Nuestros resultados concuerdan con los resultados previamente publicados. Encontramos que la Src se autofosforilaba en Tyr416 a los 30 minutos (tal y como comentábamos más arriba), seguido de la fosforilación de EGFR en Tyr845 unos minutos después (a los 60 minutos) cuando inyectamos los 3 IgG-PV. Esta vía podría ser la vía independiente de ligandos previamente publicada y comentada. Pero, además, EGFR pudo ser también activado vía ligandos a partir de 60 minutos también, con un aumento previo de ADAM10, como se ha explicado. La importancia de estos hallazgos se reforzó por la observación de inhibición de la autofosforilación de Src en Tyr416 y de EGFR en Tyr845, por el inhibidor de Src que anula su actividad. Este mecanismo está observado también en la literatura (Tatton *et al.*, 2003), con otros efectos celulares similares (Dahl, Arai and Watanabe, 2000; Mócsai *et al.*, 1999). Es decir, la acción de la Src de forma precoz podría modular EGFR, observando que todo se abolió por la acción de su inhibidor.

5. La administración de inhibidores de Src y ADAM10 suprime el incremento en la actividad de esta metaloproteasa y de los ligandos de EGFR.

Ahora bien, dada la interacción de la TK Src con la ADAM10 (Yan, Shirakabe and

Werb, 2002; Ebsen *et al.*, 2014), y su regulación por otros sistemas como tetraspains TspanC8 (Matthews *et al.*, 2017), se nos planteaba si la primera (Src) podría también regular esta metaloproteasa y los ligandos liberados por ella, y tener una función más amplia en el PV.

Estos estudios reforzaron nuestros siguientes hallazgos. Observamos que la administración del inhibidor de Src (PP1) permitió inhibir el incremento precoz de la actividad de ADAM10 tras administrar IgG-PV1 o IgG-PV2, y a su vez la liberación posterior de ligandos de EGFR, como EGF y BTC. Este mismo efecto se encontró con el inhibidor de ADAM10, GI254023X. Así pues, pudimos establecer que, durante la acantólisis suprabasal en el PV, se lleva a cabo una activación de esta metaloproteasa a los pocos minutos se administrar IgG-PV, seguido de la liberación de ligandos de EGFR, con activación posterior de este receptor TK, y todo este proceso es controlado al menos por Src.

Esta vía Src-ADAM10-ligandos HER, descritos en la acantólisis del PV por primera vez en nuestro estudio, se ha implicado también recientemente en otros sistemas celulares. En concreto, se ha descrito que en la proliferación de las células tumorales de los adenomas hipofisarios interviene de forma directa también esta vía (Huang *et al.*, 2019). En este modelo celular, se observó que en la porción intracitoplasmática de la ADAM10 podía competir la Src con la calmodulina 1, favoreciendo aquella la proliferación celular por la acción de esta metaloproteasa. Además, encontraron un hallazgo que puede abrir un nuevo camino en el tratamiento fisiopatológico del PV, al observar que solo eran capaces de controlar la proliferación celular cuando se administraban al medio inhibidores de las dos, de la Src y de la ADAM10, y no de cada una por separado. Resultados similares fueron obtenidos unos años antes (Pan *et al.*, 2012). En nuestro caso, como comentábamos, ambos inhibidores produjeron el efecto deseado (anulación del incremento de la actividad de la ADAM10 y de la liberación de los ligandos), pero quizá en el paciente con PV podría ser necesaria la administración de ambos fármacos para conseguir la supresión de la enfermedad como la observamos en nuestro modelo.

También, en las fibras de músculo liso de las arterias coronarias, la activación de EGFR a través del ligando HB-EGF, es un proceso mediado, entre otras moléculas, por la TK Src (Duru, Fu and Davies, 2014).

Pero existen también otros modelos celulares en los que esta vía Src-ADAM10-liberación de ligandos/mediadores puede tomar parte, aunque no se relacionen finalmente con los receptores HER. Se ha encontrado que el incremento de FasL mediado por ADAM10 en linfocitos T es dependiente también de Src, y su inhibición provoca una supresión en la liberación de este ligando (Ebsen *et al.*, 2015). Por tanto, esta vía es utilizada normalmente por muchas células para llevar a cabo sus funciones celulares fisiológicas. En el PV, como comentábamos más arriba, durante la acantólisis probablemente se magnifiquen vías que utiliza la célula en condiciones normales, más que polimorfismos moleculares o nuevas vías inducidas durante este proceso. Los Ac circulantes producidos intensificarían en un periodo corto de tiempo estas vías fisiológicas de señalización intracelular.

Los resultados con IgG-PV3 siguieron siendo sorprendentes. Ya habíamos confirmado que esta fracción de IgG-PV no incrementaba la actividad de ADAM10, ni producía incremento de los ligandos del EGFR, EGF y BTC. A pesar de esto, sí que se observó una expresión de Src Tyr416 y también de EGFR Tyr845 en capa basal. Ambas expresiones se anularon con el tratamiento previo de los ratones de PP1 (inhibidor de Src). Quizá, esta ausencia de liberación de ligandos y de actividad de ADAM10, a pesar de fosforilación de EGFR Tyr845 por Src confirma una de las vías de activación de receptores TK independientes de ligandos (Hackel *et al.*, 1999).

6. La supresión de la actividad de Src, ADAM10 y EFGR, así como de la unión de EGF a su receptor, anula la acantólisis suprabasal.

Los resultados encontrados hasta este momento nos mostraron una serie de vías activadas, implicadas en muchos modelos celulares en el crecimiento de los tejidos, crecimiento de tumores, diferenciación celular, o morfogénesis, entre otras acciones. Sin embargo, era necesario confirmar que también su acción estaba dirigida hacia la acantólisis suprabasal. Es decir, su activación contribuía de forma directa y necesaria, en último término, en la separación de los queratinocitos.

Para llevar a cabo estos estudios éramos conscientes que el modelo *in vivo* es mejor que el *in vitro* (cultivos celulares), ya que en el primero se orquestan de forma coordinada todas las vías que operan en un organismo vivo, y pueden reflejar mejor

lo que ocurre en el paciente. Es por este motivo por el que desde un inicio utilizamos el modelo animal murino de PV.

Hasta ahora, se nos presentaban dos escenarios en nuestro estudio, con resultados en cada uno que tenían que confirmarse como necesarios para implicarlos en la acantólisis del PV:

-Por una parte, teníamos que el eje Src-ADAM10-ligandos de HER-EGFR tenía un papel patogénico en esta enfermedad. Hasta ahora habíamos observado estos hallazgos con las fracciones IgG-PV1 y IgG-PV2. Debíamos comprobar si, como en otros modelos celulares antes comentados, la interrupción en su transmisión bloquea la adhesión entre los queratinocitos.

- Por otra parte, habíamos observado hallazgos diferentes con IgG-PV3. Esta fracción presentaba una característica distinta a las otras dos fracciones de IgG-PV utilizadas: ésta presentaba unos títulos elevados de Ac anti-Dsg1 y Ac anti-Dsg3, pero sobre todo tenía también Ac anti-Dsc3 elevados en sangre. Al igual que en otros casos publicados (Makino *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2012), esto se había traducido en el paciente en una forma severa de enfermedad, y en los ratones en la presencia de lesiones cutáneas de forma más precoz (la mitad de tiempo que IgG-PV1 y IgG-PV2), y acantólisis suprabasal también más precoz y severa que con las otras dos fracciones. Pero, además, desde el punto de vista molecular, esta fracción de IgG-PV tenía peculiaridades propias: no producía incremento precoz de ADAM10 ni de ligandos de HER, a pesar de observar aumento en la expresión de Src P-Tyr416 y de EGFR P-Tyr845 en la capa basal de la epidermis después de inyectar a los ratones IgG-PV3.

¿Estos dos grupos de hallazgos significaban que en los pacientes con PV se pueden observar fenotipos clínicos diferentes, todos ellos con los mismos hallazgos histológicos propios de la enfermedad, pero a través de mecanismos diferentes? Lo primero que teníamos que hacer para responder esta cuestión era comprobar cuál era la respuesta de nuestro modelo cuando se administraban los inhibidores de cada molécula implicada.

Respecto al primero de los grupos, como cabía esperar, se encontró una supresión completa de los ratones al tratarles con inhibidores de Src, ADAM10 y EGFR. Además, se encontró supresión de la enfermedad al tratar los ratones con Ctx, un

inhibidor de la unión de los ligandos a EGFR. Esto significaba que la presencia de Ac anti-Dsg1 y Ac anti-Dsg3 puede producir lesiones de PV a través de un incremento de ADAM10 y de ligandos producidos por ella, y de una manera dependiente de Src. La acción necesaria de estos ligandos activando EGFR se confirmó al anularse la enfermedad con la administración de Ctx. Por tanto, con IgG-PV que presente este perfil de Ac, la acantólisis se llevaría a cabo principalmente en una forma dependiente de EGFR vía ADAM10. Es decir, sería un fenotipo clínico que tendría estos marcadores moleculares.

Ante estos hallazgos tenemos que preguntarnos si podemos trasladar esta información a los pacientes. Es decir, si identificados los fenotipos clínicos y moleculares de PV con estas características, podríamos utilizar inhibidores de estas moléculas con algún éxito.

Respecto a los inhibidores de ADAM10, se ha observado que, en pacientes con neoplasias, podían ser más eficaces cuando se administraban en combinación con Ac frente al EGFR, que cuando se administraban cada uno por separado (Dong *et al.*, 1999). Más recientemente, y también en tumores dependientes de isoformas HER, la administración de inhibidores más específicos de ADAM10 han mostrado más eficacia aun también administrados junto a inhibidores de HER (Liu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006).

Ahora bien, queda por saber si se podrían utilizar los mismos principios terapéuticos en otros procesos inflamatorios o inmunológicos en los que se ha descrito una actividad de ADAM10 (Saftig and Reiss, 2011): eczema (Maretzky *et al.*, 2008), psoriasis (Kawaguchi, Mitsuhashi and Kondo, 2005), o en enfermedades cardiovasculares (Schulz *et al.*, 2008), o enfermedad de Alzheimer (Bonda *et al.*, 2011), entre otros.

Y en el segundo escenario, los resultados son más impresionantes. El perfil de Ac de esos pacientes tiene unas características determinadas y marcan también un fenotipo de PV: presentan Ac anti-Dsg1 y anti-Dsg3, pero además tienen Ac anti-Dsc. Y desde el punto de vista clínico e histológico muestran un patrón diferente: despegamiento epidérmico y acantólisis más intensas y precoces. Y, por último, a diferencia del grupo fenotípico anterior, no está mediado por ADAM10, a pesar de mostrar activación de Src Tyr416 y EGFR Tyr845. Y no se inhibe la enfermedad con

cada uno de los fármacos empleados, incluidos inhibidores de Src y EGFR.

En este último supuesto no tenemos una respuesta definida para sustentar el mecanismo de acción de los Ac que presentan los pacientes con este perfil. Debería ser un mecanismo donde la respuesta en la célula es más corta hasta producir la separación entre los queratinocitos (histológicamente a las 4 horas), y que se expresa por una clínica más severa. Hace suponer que tiene que ser una vía de producción que opere en un plazo de tiempo más breve.

Quizá, el mecanismo por el cual se produzca acantólisis suprabasal en el PV en pacientes que tienen Ac circulantes anti-Dsc3 junto a Ac anti-Dsg3 y anti-Dsg1, pueda ser a través de un proceso de *steric hindrance*, es decir, de separación de las cadherinas de los desmosomas por la acción directa de los Ac, sin mediar la activación de vías intracelulares inicialmente, como se ha propuesto en algunos pacientes con PV (Waschke and Spindler, 2014; Saito *et al.*, 2012; Sharma, Mao and Payne, 2007; Sitaru and Zillikens, 2005; Kitajima and Aoyama, 2007). Es decir, se produciría un bloqueo en la adhesión *trans* homofílica entre las cadherinas, favoreciendo su disociación, y permitiendo que las células se separen. Si se produce una activación de vías de señalización en las células sería secundaria, y no primaria como causa de esta separación. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con fracciones de IgG-PV que contenían Ac anti-Dsg. En concreto, la administración de Ac monoclonales anti-Dsg3 producían este efecto *outside-in*, dañando la adhesión de las cadherinas y produciendo después este efecto intracelular (Kawasaki *et al.*, 2006). La falta de respuesta a los inhibidores empleados y que sí actúan en los pacientes sin Ac anti-Dsc habla a favor de este posible mecanismo implicado. En estos casos se produciría también acantólisis suprabasal.

7. La disminución progresiva de los niveles de los anticuerpos anti-desmocolina 3 restablece la actividad de ADAM10.

Si aceptamos nuestros resultados, llegamos a un punto en que tenemos que admitir que en aquellos pacientes con PV que presenten un perfil de Ac con anti-Dsg1 y anti-Dsg3, junto a anti-Dsc3, la acción de estos Ac en los queratinocitos deberá ser de uno

de estos dos modos: o que tengan una acción sinérgica entre ellos, o que tome el mando uno de ellos (principalmente anti-Dsg3 o anti-Dsc3).

En la literatura se han descrito pacientes con este perfil (Rafei *et al.*, 2011; Spindler *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 2015). En estos casos, se ha observado que solamente son los Ac anti-Dsc3 los que se internalizan en la célula (Makino *et al.*, 2015) y por tanto tienen una acción patogénica, mostrando una relación entre sus niveles en sangre y la actividad clínica del paciente (Weiss *et al.*, 2015). Quedaría por saber cuál sería el papel de los Ac anti-Dsg3 también presentes en esos pacientes. Quizá, el mecanismo de *steric hindrance* antes comentado, que también se ha propuesto como mecanismo inducible a través de Dsc, podría explicar los resultados encontrados (Kitajima and Aoyama, 2007). Por otra parte, al expresarse la Dsc3 en la capa basal de la epidermis de una manera similar a la Dsg3 (Legan *et al.*, 1994), explicaría que, al dominar la respuesta los Ac anti-Dsc3, histológicamente se manifestara también con acantólisis suprabasal, de igual forma que cuando “toman el mando” los Ac anti-Dsg3 (Rafei *et al.*, 2011).

Con esta información, quisimos saber si era posible modular la respuesta de IgG-PV3, disminuyendo los niveles de Ac anti-Dsc3, y observando si en esos casos la fracción resultante se asemejaba más a IgG-PV1 e IgG-PV2, es decir con una acantólisis dependiente de ADAM10. Afrontamos este punto de dos maneras. Por una parte, confeccionamos fracciones de IgG-PV con cantidades diferentes de IgG-PV2 + IgG-PV3, en las que, manteniendo la misma cantidad de anti-Dsg3 y de dosis total de IgG a los ratones, fuéramos disminuyendo la cantidad de Ac anti-Dsc3. Y por otra, realizamos inmunoadsorción de IgG-PV3 con el fin de eliminar la mayor cantidad de Ac anti-Dsc3. Cuando administramos a los ratones fracciones de IgG-PV con la cantidad más baja de Ac anti-Dsc3 (1.9 mg/gr IgG-PV2 + 0.1 mg/gr IgG-PV3) la respuesta histológica y clínica se asemejó más a la encontrada con IgG-PV2 sin modificar. Por el contrario, cuando la cantidad de Ac anti-Dsc3 fue más alto en la fracción (0.5 mg/gr IgG-PV2 + 1.5 mg/gr IgG-PV3) la respuesta histológica fue más semejante a IgG-PV3 sin modificar.

Respecto a las variaciones en la actividad de ADAM10 observamos también resultados muy interesantes. Cuando inyectamos a los ratones una fracción de IgG-PV2 + IgG-PV3 (1 mg/gr + 1 mg/gr, respectivamente), la actividad de ADAM10 se

incrementó a casi el doble de lo que se había observado con la administración solamente IgG-PV3. Esta actividad fue superior, y casi similar a la encontrada con la administración solamente de IgG-PV1, cuando inyectamos a los ratones IgG-PV3 inmunoabsorbido el 50% de Ac anti-Dsc3. Sin embargo, la administración de un inhibidor de ADAM10 en estos dos supuestos, con disminución de Ac anti-Dsc3, no anuló la enfermedad.

¿Qué significado tienen estos hallazgos? Nosotros pensamos que la presencia de Ac anti-Dsc3 induce acantólisis probablemente vía *steric hindrance*, como se ha indicado. La disminución de los Ac anti-Dsc3 desde luego permite que los Ac anti-Dsg3 presentes puedan inducir la ADAM10 como suelen hacerlo. Pero al continuar presentes Ac anti-Dsc3, aunque en diferentes niveles, todavía serán suficientes para inducir la acantólisis, por un mecanismo que antecede al de Src-ADAM10-ligandos de HER, y provocando separación en las células, aunque logremos inhibir la ADAM10 que ha aumentado. No obstante, la disminución de los Ac anti-Dsc3 hará que esta acantólisis sea menos severa que la observada con la totalidad de IgG-PV3. En condiciones normales estas variaciones moleculares, resultado de variaciones en los niveles de Ac, no las observamos en el paciente con PV. Como comentamos anteriormente (ver Introducción), fenómenos de *intermolecular epitope spreading* pueden ocurrir en los pacientes con enfermedades ampollas autoinmunes (Didona and Di Zenzo, 2018), y la aparición de Ac adicionales, o la desaparición o disminución de otros, es un hecho bien conocido. Por eso, lo observado en nuestro estudio, es la expresión molecular de un proceso inmunológico (cambio en los niveles de Ac) que puede ser habitual.

Un punto importante es también el comportamiento molecular de los Ac anti-Dsc cuando se presentan como único Ac en pacientes con pénfigo (Müller *et al.*, 2009b; Mao *et al.*, 2010; Rafei *et al.*, 2011; Hatano *et al.*, 2012; Hong, Hashimoto and Kim, 2016; Tateishi *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2018; Tay, Lee and Lim, 2018; Yamaguchi *et al.*, 2018; Iranzo *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2014; Ansai *et al.*, 2017; Geller *et al.*, 2016; Leventhal *et al.*, 2017; Saruta *et al.*, 2013), o cuando los Ac anti-Dsc se acompañan de otros Ac nDsg, pero sin Ac anti-Dsg, en pacientes que también producen lesiones de PV (Chernyavsky *et al.*, 2019). Este será un campo interesante de investigación.

8. Una propuesta a modo de conclusión.

Con los datos obtenidos en este trabajo, desearíamos realizar una propuesta de patogenia del PV (véase Fig. 37).

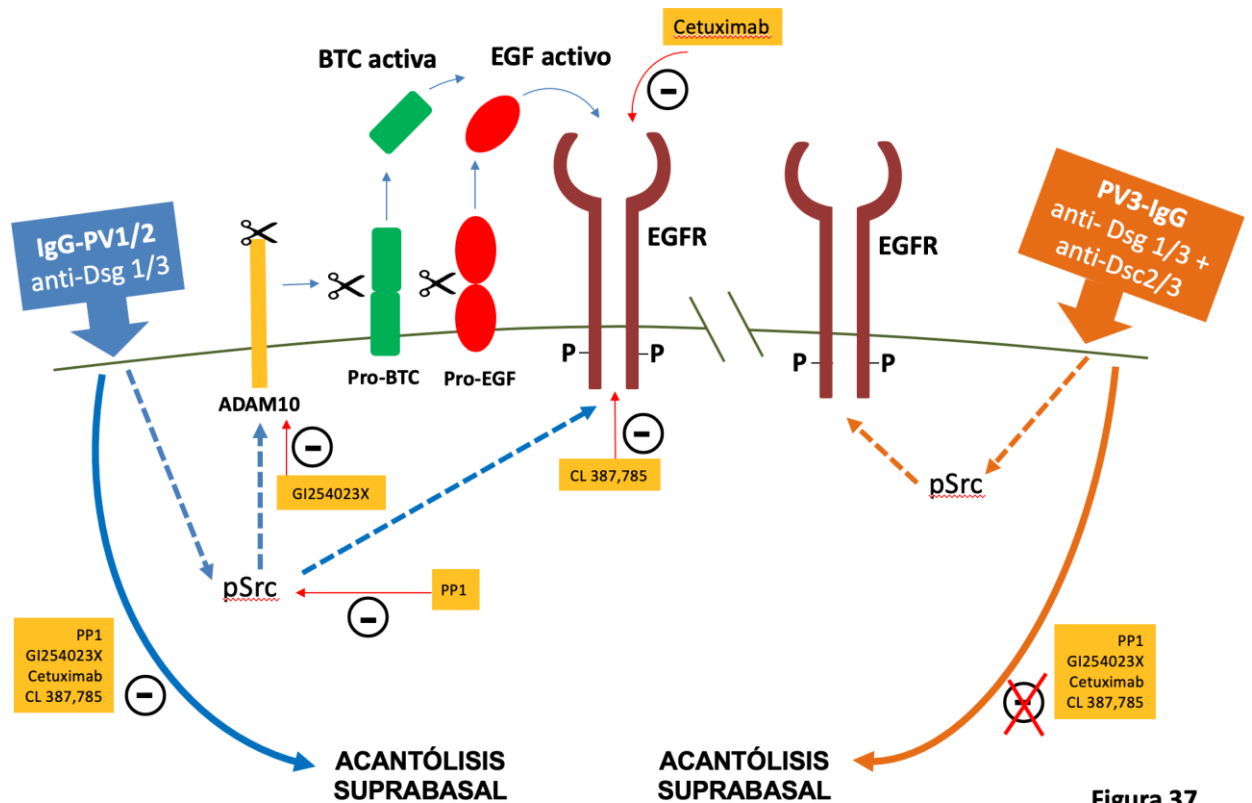


Figura 37

Figura 37. Modelo propuesto de la fisiopatología del PV, incluyendo los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Nuestra propuesta es que los pacientes con PV con anti-Dsg3 y anti-Dsg1, pueden adoptar dos fenotipos clínicos, histológicos y moleculares, dependiendo de si tienen asociados o no Ac anti-Dsc3 (véase Fig. 38).

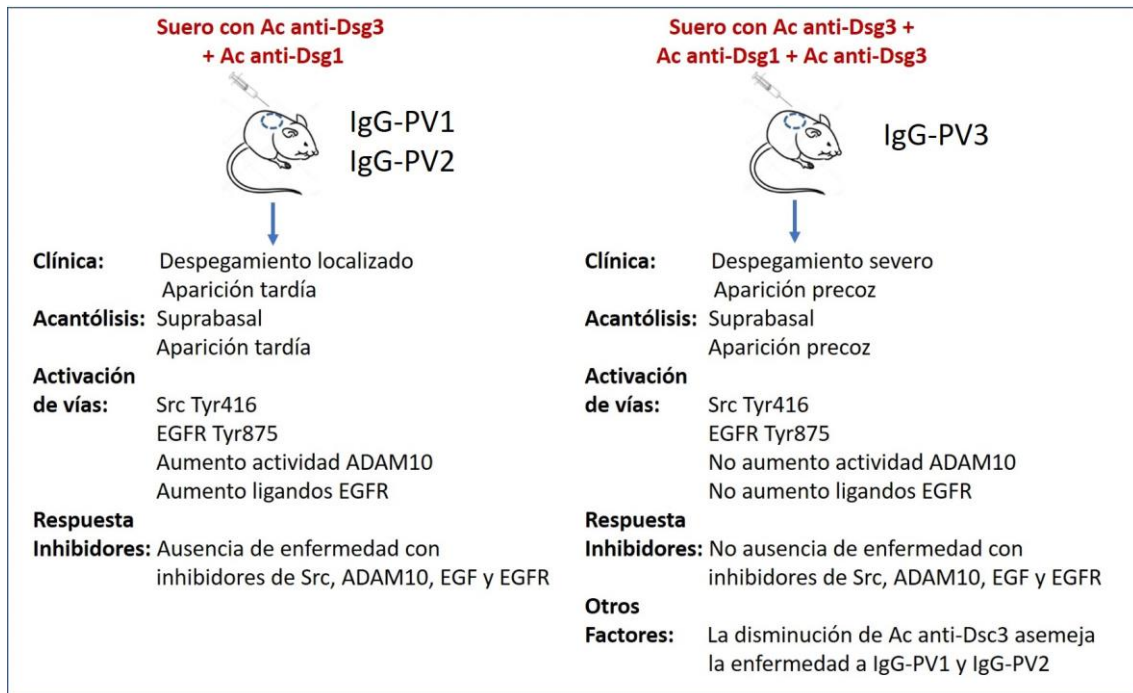


Figura 38. Fenotipos de PV encontrados en nuestro estudio, y características de cada uno.

Por una parte, en aquellos casos en los que se asocia solo Ac anti-Dsg3 y anti-Dsg1, la acantólisis estará mediada por el eje Src-ADAM10-ligandos de HER-EGFR. En estos casos, la acantólisis suprabasal se anulará con inhibidores de Src, ADAM10, EGFR y de EGF. La enfermedad dependerá de los niveles de Ac anti-Dsg3.

Por el contrario, aquellos casos que asocian Ac anti-Dsg3 y anti-Dsg1, junto a Ac anti-Dsc3, presentarán una clínica más severa, y mostrarán también acantólisis suprabasal. La acantólisis, en un modelo de inducción, se producirá antes que en el caso anterior. La separación entre los queratinocitos no se podrá anular con inhibidores de Src, ADAM10, ligandos de HER, o de EGFR, por lo que se deduce que esta vía no participaría en la acantólisis suprabasal. La acción dominante será de los Ac anti-Dsc3, por lo que su modulación hará que la enfermedad se parezca más al fenotipo clínico anterior. Probablemente, la no inducción de estas vías intracelulares parece indicar que un mecanismo de alteración física de la adhesión de las cadherinas en los desmosomas (*steric hindrance*) podría tener un papel determinante.

Esta clasificación no incluye otros posibles fenotipos clínicos de pénfigo, como comentábamos, con o sin Ac anti-Dsg y anti-Dsc, o incluso con solamente otros Ac

nDsg descritos recientemente, y que también pueden manifestarse histológicamente como acantólisis suprabasal. En muchos de esos pacientes, probablemente, solo se ha llegado al diagnóstico a través de la histología y de la IFD, mostrando las características del PV en general. Sin embargo, cuando podamos llevar a cabo estudios inmunológicos a más escala y determinar de forma habitual otros Ac nDsg en estos pacientes, podremos tener más conocimientos de esta apasionante enfermedad, y detectar otros fenotipos de PV.

6. CONCLUSIONES

1. Aunque en todos los casos de PV tiene lugar una acantólisis suprabasal, nuestro estudio demuestra que el tiempo transcurrido para que esta separación entre los queratinocitos se produzca, así como su intensidad, dependen del perfil de Ac circulantes en cada paciente: más intensa cuando los niveles de Ac anti-Dsg3 son más elevados, y más intensa y precoz cuando se combinan Ac anti-Dsg1/3 y Ac anti-Dsc3.
2. La observación de un aumento precoz de la actividad de ADAM10 tras la administración de fracciones de IgG-PV con solamente Ac anti-Dsg; el incremento mayor de esta actividad cuando los niveles de Ac anti-Dsg3 en la fracciones inyectadas son más elevados; y la observación de este aumento de actividad también cuando se eliminan los Ac anti-Dsc de las fracciones de IgG-PV, nos hablan a favor del papel de los Ac anti-Dsg, especialmente de los Ac anti-Dsg3, en el incremento de la actividad de esta metaloproteasa en pacientes con PV. Por tanto, este hallazgo novedoso nos plantea dos posibles mecanismos de acantólisis suprabasal en el PV: mediado por activación de ADAM10 (en pacientes con solo Ac anti-Dsg); o no mediado por ADAM10 (en pacientes con Ac anti-Dsg + Ac anti-Dsc).
3. Hemos observado un eje activo Src-ADAM10-ligandos de EGFR-EGFR en pacientes con PV. Este eje tiene un papel en la acantólisis del PV solamente en pacientes con Ac anti-Dsg, pero sin anti-Dsc. El hecho de que su activación se produzca antes de que aparezca la acantólisis histológica y de que la inhibición de Src y ADAM10 anule la producción de ligandos de EGFR confirma esta interconexión. Por otra parte, las IgGs de pacientes con Ac anti-Dsg + Ac anti-Dsc producen también una fosforilación precoz de Src y EGFR, pero sin elevación de ligandos como BTC y EGF, lo que indica una activación diferente de este eje, no implicada en la acantólisis suprabasal.
4. Además, la administración de inhibidores de Src, ADAM10, EGF y EGFR produjo una inhibición de acantólisis suprabasal solamente con las fracciones IgG-PV que indujeron un incremento en los ligandos BTC y EGF. Es decir, solamente se observó este efecto con las fracciones que tenían Ac anti-Dsg sin Ac anti-Dsc. Todos estos hallazgos nos hacen ver que, quizá, en el PV, aunque en todos los

pacientes se produce acantólisis suprabasal, los mecanismos para producirla no serán los mismos en todos los pacientes, pudiéndose presentar varios fenotipos clínico-inmunológicos. Por una parte, pacientes con PV con Ac anti-Dsg3/1, desarrollarán acantólisis tardía (más precoz cuanto mayor sea el nivel de Ac anti-Dsg3), mediante activación de ADAM10 y liberación de ligandos de EGFR. Otros pacientes con PV y con Ac anti-Dsg3/1 + Ac nDsg (Ac anti-Dsc3 y quizás otros Ac) desarrollarían acantólisis más severa y precoz, no mediada por ADAM10 y ligandos de EGFR. En estos casos, la acantólisis estaría mediada quizá por un mecanismo de acción directa de los Ac, principalmente Ac anti-Dsc, sobre los desmosomas, mecanismo conocido como *steric hindrance*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

El estilo de referencias bibliográficas que se ha empleado en la elaboración de esta tesis doctoral es ***Cite Them Right 10th edition-Harvard***.

<https://www.citethemrightonline.com/About>

- Abasq, C. *et al.* (2009) 'ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus.', *Archives of Dermatology*, 145(5), pp. 529–35. doi: 10.1001/archdermatol.2009.9.
- Aguado, L. *et al.* (2009) 'Lesions of pemphigus vulgaris on irradiated skin.', *Clinical and Experimental Dermatology*, 34(5), pp. e148-50. doi: 10.1111/j.1365-2230.2008.03084.x.
- Ahmed, A. R. *et al.* (1990) 'Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), pp. 7658–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2217197>.
- Ahmed, A. R. (2013) 'Management of autoimmune bullous diseases: Pharmacology and therapeutics', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(3), pp. 476–477. doi: 10.1016/j.jaad.2012.09.022.
- Ahmed, A. R. *et al.* (2016) 'Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology.', *Experimental Dermatology*, 25(11), pp. 839–846. doi: 10.1111/exd.13106.
- Akhyani, M. *et al.* (2008) 'Cervicovaginal involvement in pemphigus vulgaris: a clinical study of 77 cases.', *The British Journal of Dermatology*, 158(3), pp. 478–82. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08356.x.
- Akman, A., Uzun, S. and Alpsoy, E. (2010) 'Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: a prospective study.', *Skinmed*, 8(1), pp. 12–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839419>.
- Al-Jassar, C. *et al.* (2013) 'Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases.', *Journal of Molecular Biology*, 425(21), pp. 4006–22. doi: 10.1016/j.jmb.2013.07.035.
- Alcaide-Martín, A. J. *et al.* (2010) '[Epidemiologic study of 20 cases of pemphigus

- at Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, Spain]’, *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 101(6), pp. 524–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738971>.
- Alemà, S. and Salvatore, A. M. (2007) ‘p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue.’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(1), pp. 47–58. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.06.001.
 - Alpsy, E., Akman-Karakas, A. and Uzun, S. (2015) ‘Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid.’, *Archives of Dermatological Research*, 307(4), pp. 291–8. doi: 10.1007/s00403-014-1531-1.
 - Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. and Stanley, J. R. (1991) ‘Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion.’, *Cell*, 67(5), pp. 869–77. doi: 10.1016/0092-8674(91)90360-b.
 - Amagai, M. *et al.* (1992) ‘Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic.’, *The Journal of Clinical Investigation*, 90(3), pp. 919–26. doi: 10.1172/JCI115968.
 - Amagai, M. *et al.* (1994) ‘Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus.’, *The Journal of Clinical Investigation*, 94(1), pp. 59–67. doi: 10.1172/JCI117349.
 - Amagai, M. *et al.* (1996) ‘Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients.’, *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(2), pp. 351–5. doi:10.1111/1523-1747.ep12343081.
 - Amagai, M., Tsunoda, K., *et al.* (1999) ‘The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile.’, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(2 Pt 1), pp. 167–70. doi: 10.1016/s0190-9622(99)70183-0.
 - Amagai, M., Komai, A., *et al.* (1999) ‘Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus.’,

The British Journal of Dermatology, 140(2), pp. 351–7. doi: 10.1046/j.1365-2133.1999.02752.x

- Amagai, M. *et al.* (2000) 'Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus.', *The Journal of Clinical Investigation*, 105(5), pp. 625–31. doi: 10.1172/JCI8748.
- Amber, K. T. *et al.* (2013) 'Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris', *Experimental Dermatology*. doi: 10.1111/exd.12229.
- Amber, K. T., Valdebran, M. and Grando, S. A. (2018) 'Non-desmoglein antibodies in patients with pemphigus vulgaris', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1190. doi: 10.3389/fimmu.2018.01190.
- Anhalt, G. J. *et al.* (1982) 'Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of igG from patients with the disease', *New England Journal of Medicine*, 306(20), pp. 1189–1196. doi: 10.1056/NEJM198205203062001.
- Anhalt, G. J. *et al.* (1986) 'Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice.', *Journal of Immunology (Baltimore)*, 137(9), pp. 2835–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3760574>.
- Anhalt, G. J. (1999) 'Making sense of antigens and antibodies in pemphigus.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(5 Pt 1), pp. 763–6. doi: 110.1016/s0190-9622(99)70161-1
- Aoyama, Y., Owada, M. K. and Kitajima, Y. (1999) 'A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes.', *European Journal of Immunology*, 29(7), pp. 2233–40. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2233::AID-IMMU2233>3.0.CO;2-4.
- Aoyama, Y., Nagai, M. and Kitajima, Y. (2010) 'Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune complexes rather than directly splitting desmosomes.', *The British Journal of Dermatology*, 162(5), pp. 1049–55. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09672.x.
- Arakawa, M. *et al.* (2009) 'Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus', *Journal of Dermatological Science*, 53(3), pp. 228–231. doi:

10.1016/j.jdermsci.2008.09.008.

- Arnemann, J. *et al.* (1993) 'Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis.', *Journal of Cell Science*, 104 (Pt 3), pp. 741–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314871>.
- Arnette, C. *et al.* (2016) 'In vitro model of the epidermis: connecting protein function to 3d structure.', *Methods in Enzymology*, 569, pp. 287–308. doi: 10.1016/bs.mie.2015.07.015.
- Arredondo, J. *et al.* (2005) 'Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus.', *The American Journal of Pathology*, 167(6), pp. 1531–44. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61239-4.
- Ashworth, J. *et al.* (1987) 'Death in pemphigus vulgaris caused by lower gastrointestinal hemorrhage.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 16(2 Pt 1), pp. 394–5. doi: 10.1016/s0190-9622(87)80143-3.
- Asnaghi, L. *et al.* (2004) 'mTOR: a protein kinase switching between life and death.', *Pharmacological Research*, 50(6), pp. 545–9. doi: 10.1016/j.phrs.2004.03.007.
- Atzmony, L. *et al.* (2015) 'The role of adjuvant therapy in pemphigus: A systematic review and meta-analysis', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(2), pp. 264–271. doi: 10.1016/j.jaad.2015.04.038.
- Barros, F. F. T. *et al.* (2010) 'Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments.', *Histopathology*, 56(5), pp. 560–72. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03494.x.
- Baruzzi, A., Cavegion, E. and Berton, G. (2008) 'Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(14), pp. 2175–2190. doi: 10.1007/s00018-008-8005-6.
- Beissert, S. *et al.* (2006) 'A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of pemphigus', *Archives of Dermatology*, 142(11), pp. 1447–54. doi: 10.1001/archderm.142.11.1447.
- Bektas, M. and Rubenstein, D. S. (2009) 'Perp and pemphigus: a disease of desmosome destabilization.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(7),

pp. 1606–8. doi: 10.1038/jid.2009.117.

- Bektas, M. *et al.* (2013) 'A pathophysiologic role for epidermal growth factor receptor in pemphigus acantholysis.', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13), pp. 9447–56. doi: 10.1074/jbc.M112.438010.
- Benati, D. and Baldari, C. T. (2008) 'SRC family kinases as potential therapeutic targets for malignancies and immunological disorders.', *Current Medicinal Chemistry*, 15(12), pp. 1154–65. doi: 110.2174/092986708784310404.
- Benoit Corven, C. *et al.* (2003) '[Treatment of pemphigus vulgaris by azathioprine and low doses of prednisone (Lever scheme)]', *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 130(1 Pt 1), pp. 13–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12605150>.
- Benvenuti, S. *et al.* (2007) 'Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies', *Cancer Research*, 67(6), pp. 2643–2648. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4158.
- Berkowitz, P. *et al.* (2005) 'Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization.', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp. 23778–84. doi: 10.1074/jbc.M501365200.
- Beutner, E. H. and Jordon, R. E. (1964) 'Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining.', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York)*, 117, pp. 505–10. doi: 10.3181/00379727-117-29622.
- Beutner, E. H. *et al.* (1965) 'Autoantibodies in pemphigus vulgaris: response to an intercellular substance of epidermis.', *JAMA*, 192(8), pp. 682–8. doi: 10.1001/jama.1965.03080210026006.
- Beutner, E. H., Rhodes, E. L. and Holborow, E. J. (1967) 'Autoimmunity in chronic bullous skin diseases. Immunofluorescent demonstration of three types of antibodies to skin in sera of patients with pemphigus, bullous pemphigoid and in

- other human sera.', *Clinical and Experimental Immunology*, 2(2), pp. 141–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5340134>.
- Beutner, E. H., Jordon, R. E. and Chorzelski, T. P. (1968) 'The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 51(2), pp. 63–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4897477>.
 - Bhol, K., Mohimen, A. and Ahmed, R. (1994) 'Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris', *Dermatology*, 189(1), pp. 85–89. doi: 10.1159/000246938. doi: 10.1159/000246938.
 - Bhol, K. *et al.* (1995) 'Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), pp. 5239–43. doi: 10.1073/pnas.92.11.5239.
 - Bierkamp, C. *et al.* (1999) 'Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice.', *Development (Cambridge, England)*, 126(2), pp. 371–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847250>.
 - Bilgic Temel, A. and Murrell, D. F. (2019) 'Pharmacological advances in pemphigus.', *Current Opinion in Pharmacology*, 46, pp. 44–49. doi: 10.1016/j.coph.2019.01.001.
 - Bonda, D. J. *et al.* (2011) 'The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations', *The Lancet Neurology*, 10(3), pp. 275–279. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70013-8.
 - Brazil, D. P. and Hemmings, B. A. (2001) 'Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow.', *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11), pp. 657–64. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01958-2.
 - Brenner, S. and Goldberg, I. (2011) 'Drug-induced pemphigus.', *Clinics in Dermatology*, 29(4), pp. 455–7. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.016.
 - Brenner, S. and Wohl, Y. (2007) 'A survey of sex differences in 249 pemphigus patients and possible explanations.', *Skinmed*, 6(4), pp. 163–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618167>.
 - de Bruin, A. *et al.* (2007) 'Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal

- plaque in pemphigus vulgaris.', *Experimental Dermatology*, 16(6), pp. 468–75. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00557.x.
- Brownlow, N. *et al.* (2014) 'Regulation of the cytokinesis cleavage furrow by PKC ϵ ', *Biochemical Society Transactions*, 42(6), pp. 1534–1537. doi: 10.1042/BST20140240.
 - Brunet, A. *et al.* (1999) 'Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.', *Cell*, 96(6), pp. 857–68. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80595-4.
 - Burgess, A. W. *et al.* (2003) 'An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors.', *Molecular Cell*, 12(3), pp. 541–52. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00350-2.
 - Bystryn, J.-C. and Grando, S. A. (2006) 'A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(3), pp. 513–6. doi: 10.1016/j.jaad.2005.12.003.
 - Bystryn, J. C. and Steinman, N. M. (1996) 'The adjuvant therapy of pemphigus. An update.', *Archives of Dermatology*, 132(2), pp. 203–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8629830>.
 - Calautti, E. *et al.* (2005) 'Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death.', *The Journal of biological chemistry*, 280(38), pp. 32856–65. doi: 10.1074/jbc.M506119200.
 - Caldelari, R. *et al.* (2001) 'A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris.', *The Journal of Cell Biology*, 153(4), pp. 823–34. doi: 10.1083/jcb.153.4.823.
 - Carducci, M. *et al.* (2008) 'Nail involvement in pemphigus vulgaris.', *Acta Dermato-Venereologica*, 88(1), pp. 58–60. doi: 10.2340/00015555-0255.
 - Carnero, A. (2010) 'The PKB/AKT pathway in cancer.', *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), pp. 34–44. doi: 10.2174/138161210789941865.
 - Ceresa, B. P. and Peterson, J. L. (2014) 'Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor', in *International Review of Cell and Molecular Biology* 313, pp.145-78. doi: 10.1016/B978-0-12-800177-6.00005-0.

- Chen J, Den Z and Koch PJ. (2008) 'Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering'. *Journal of Cell Science*; 121, pp. 2844-9. doi: 10.1242/jcs.031518.
- Chen, Y. *et al.* (2015) 'Critical role of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the pathogenic action of antimitochondrial autoantibodies synergizing with anti-desmoglein autoantibodies in pemphigus vulgaris', *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), pp. 23826–23837. doi: 10.1074/jbc.M115.668061.
- Chen, J. *et al.* (2018) 'Regulatory effects of Nr4a2 on Th2 cells from patients with pemphigus vulgaris.', *Oncotarget*, 9(13), pp. 11258–11267. doi: 10.18632/oncotarget.24371.
- Chen, Z. *et al.* (2018) 'EGFR family and Src family kinase interactions: mechanics matters?', *Current Opinion in Cell Biology*, 51, pp. 97–102. doi: 10.1016/j.ceb.2017.12.003.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Vetter, D. E., *et al.* (2007a) 'Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization.', *Experimental Cell Research*, 313(16), pp. 3542–55. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.011.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Kitajima, Y., *et al.* (2007b) 'Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens.', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18), pp. 13804–12. doi: 10.1074/jbc.M611365200.
- Chernyavsky, A. *et al.* (2015) 'Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptolysis.', *International Immunopharmacology*, 29(1), pp. 76–80. doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.046.
- Cho, M. J., Ellebrecht, C. T. and Payne, A. S. (2015) 'The dual nature of interleukin-10 in pemphigus vulgaris', *Cytokine*, 73(2), pp. 335–341. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.002.
- Cirillo, N. *et al.* (2012) 'Urban legends: Pemphigus vulgaris', *Oral Diseases*, 18(5), pp. 442-458. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01899.x.

- Cirillo, N. *et al.* (2014) 'Pemphigus vulgaris autoimmune globulin induces Src-dependent tyrosine-phosphorylation of plakophilin 3 and its detachment from desmoglein 3.', *Autoimmunity*, 47(2), pp. 134–40. doi: 10.3109/08916934.2013.866100.
- Christian, L. M. (2012) 'The ADAM family: Insights into Notch proteolysis.', *Fly*, 6(1), pp. 30–4. doi: 10.4161/fly.18823.
- Cichocki, M. *et al.* (2014) 'Naturally occurring phenolic acids modulate TPA-induced activation of EGFR, AP-1, and STATs in mouse epidermis', *Nutrition and Cancer*, 66(2), pp. 308–314. doi: 10.1080/01635581.2014.864419.
- Colliou, N. *et al.* (2013) 'Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response.', *Science Translational Medicine*, 5(175), p. 175ra30. doi: 10.1126/scitranslmed.3005166.
- Coronel-Pérez, I. M. *et al.* (2009) '[Epidemiology of pemphigus in the Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain, 2005-2006].', *Actas Dermosifiliograficas*, 100(2), pp. 121–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445876>.
- Crawford, H. C. *et al.* (2009) 'ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation.', *Current Pharmaceutical Design*, 15(20), pp. 2288–99. doi: 10.2174/138161209788682442.
- Creagh, E. M., Conroy, H. and Martin, S. J. (2003) 'Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity.', *Immunological Reviews*, 193, pp. 10–21. doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00048.x.
- Cuevas-Gonzalez, J. C. *et al.* (2016) 'Detection of apoptosis in pemphigus vulgaris by TUNEL technique.', *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(3), pp. 296–9. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164598.
- Czernik, A. *et al.* (2012) 'Intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune bullous dermatoses: An update', *Autoimmunity*, 45(1), pp. 111–118. doi: 10.3109/08916934.2011.606452.
- Dahl, M. E., Arai, K. I. and Watanabe, S. (2000) 'Association of Lyn tyrosine kinase

to the GM-CSF and IL-3 receptor common betac subunit and role of Src tyrosine kinases in DNA synthesis and anti-apoptosis.', *Genes Cells*, 5(2), pp. 143-53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672044>.

- Dang, M. *et al.* (2011) 'Epidermal Growth Factor (EGF) ligand release by substrate-specific A disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus', *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), pp. 17704-13. doi: 10.1074/jbc.M110.187823.
- Dar, S. A. *et al.* (2011) 'Possible role of superantigens in inducing autoimmunity in pemphigus patients.', *The Journal of Dermatology*, 38(10), pp. 980-7. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01253.x.
- Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E. (1999) 'Cellular survival: a play in three Akts.', *Genes & Development*, 13(22), pp. 2905-27. doi: 10.1101/gad.13.22.2905.
- Davies, L. *et al.* (2009) 'P53 apoptosis mediator PERP: localization, function and caspase activation in uveal melanoma.', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8B), pp. 1995-2007. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00590.x.
- Davis, N. M. *et al.* (2014) 'Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention', *Oncotarget*, 5(13), pp. 4603-50. doi: 10.18632/oncotarget.2209.
- Dhandha, M. M., Seiffert-Sinha, K. and Sinha, A. A. (2012) 'Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris', *Autoimmunity*, 45(7), pp. 516-526. doi: 10.3109/08916934.2012.702811.
- Diaz, L. A. and Giudice, G. J. (2000) 'End of the century overview of skin blisters.', *Archives of Dermatology*, 136(1), pp. 106-12. doi: 10.1001/archderm.136.1.106.
- Didona, D. *et al.* (2019) 'Pemphigus: current and future therapeutic strategies.', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 1418. doi: 10.3389/fimmu.2019.01418.
- Diercks, G. F. H., Pas, H. H. and Jonkman, M. F. (2009) 'The ultrastructure of acantholysis in pemphigus vulgaris.', *The British Journal of Dermatology*, 160(2), pp. 460-1. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08971.x.

- Ding, X. *et al.* (1997) 'Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 109(4), pp. 592–6. doi: 10.1111/1523-1747.ep12337524.
- Ding, X. *et al.* (1999) 'The anti-Desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic', *Journal of Investigative Dermatology*, 112(5), pp. 739–743. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00585.x.
- Dittmer, A. *et al.* (2009) 'Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(18), pp. 3053-65. doi: 10.1007/s00018-009-0089-0.
- Dong, J. *et al.* (1999) 'Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), pp. 6235–40. doi: 10.1073/pnas.96.11.6235.
- Doukaki, S. *et al.* (2015) 'Mycophenolate mofetil and enteric-coated mycophenolate sodium in the treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus', *Journal of Dermatological Treatment*, 26(1), pp. 67–72. doi: 10.3109/09546634.2014.880395.
- Duffy, M. J. *et al.* (2011) 'The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?', *Clinical Proteomics*, 8(1), p.9. doi: 10.1186/1559-0275-8-9.
- Dumas, V. *et al.* (1999) 'The treatment of mild pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus with a topical corticosteroid.', *The British Journal of Dermatology*, 140(6), pp. 1127–9. doi: 10.1046/j.1365-2133.1999.02895.x.
- Duru, E. A., Fu, Y. and Davies, M. G. (2014) 'Protease-mediated human smooth muscle cell proliferation by urokinase requires epidermal growth factor receptor transactivation by triple membrane signaling.', *The Journal of Surgical Research*, 192(2), pp. 254–62. doi: 10.1016/j.jss.2014.06.054.
- Ebsen, H. *et al.* (2014) 'Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the α Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10)', *PLoS ONE*, 9(7), e10289. doi: 10.1371/journal.pone.0102899.

- Ebsen, H. *et al.* (2015) 'Subcellular localization and activation of ADAM proteases in the context of FasL shedding in T lymphocytes.', *Molecular Immunology*, 65(2), pp. 416–28. doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.008.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M. and Pennington, C. J. (2009) 'The ADAM metalloproteinases', *Molecular Aspects of Medicine* 29(5), pp. 258-89. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.001.
- Emery, D. J. *et al.* (1995) 'Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(3), pp. 323–8. doi: 10.1111/1523-1747.ep12665364.
- Eming, R. and Hertl, M. (2006) 'Immunoabsorption in pemphigus', *Autoimmunity*, 39(7), pp. 609–616. doi: 10.1080/08916930600972040.
- Endres, K. and Fahrenholz, F. (2012) 'Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity'. *Experimental Brain Research*, 217(3-4), pp. 343-52. doi: 10.1007/s00221-011-2885-7.
- Enk, A. H. and Knop, J. (1999) 'Mycophenolate is effective in the treatment of pemphigus vulgaris.', *Archives of Dermatology*, 135(1), pp. 54–6. doi: 10.1001/archderm.135.1.54.
- Esaki, C. *et al.* (1995) 'Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-trisphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 105(3), pp. 329–33. doi: 10.1111/1523-1747.ep12319948.
- Eskiocak, A. H., Ozkesici, B. and Uzun, S. (2016) 'Familial pemphigus vulgaris occurred in a father and son as the first confirmed cases', *Case Reports in Dermatological Medicine*, 2016, pp. 1–4. doi: 10.1155/2016/1653507.
- España, A. *et al.* (1997) 'Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus', *Clinical Immunology and Immunopathology*, 85(1), pp. 83–89. doi: 10.1006/clin.1997.4407.
- España, A. *et al.* (2004) 'Long-term complete remission of severe pemphigus

- vulgaris with monoclonal anti-CD20 antibody therapy and immunophenotype correlations.’, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(6), pp. 974–6. doi: 10.1016/j.jaad.2003.08.021.
- España, A. *et al.* (2007) ‘Ear, nose and throat manifestations in pemphigus vulgaris’, *British Journal of Dermatology*, 156(4), pp. 733–737. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07783.x.
 - España Alonso, A. *et al.* (2009) ‘[Prolonged complete clinical remission in patients with severe pemphigus vulgaris after cycles of intravenous cyclophosphamide].’, *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 100(2), pp. 113–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445875>.
 - España, A. *et al.* (2013) ‘Neural nitric oxide synthase participates in pemphigus vulgaris acantholysis through upregulation of Rous sarcoma, mammalian target of rapamycin and focal adhesion kinase’, *Experimental Dermatology*, 22(2), pp. 125–130. doi: 10.1111/exd.12088.
 - España, A. *et al.* (2013) ‘Neural nitric oxide synthase participates in pemphigus vulgaris acantholysis through upregulation of Rous sarcoma, mammalian target of rapamycin and focal adhesion kinase’, *Experimental Dermatology*, 22(2), pp. 125–130. doi: 10.1111/exd.12088.
 - España, A. *et al.* (2014) ‘Antibodies to the amino-terminal domain of desmoglein 1 are retained during transition from pemphigus vulgaris to pemphigus foliaceus.’, *European Journal of Dermatology*, 24(2), pp. 174–9. doi: 10.1684/ejd.2014.2277.
 - España, A. *et al.* (2017) ‘Ocular involvement in pemphigus vulgaris-a retrospective study of a large Spanish cohort.’, *Journal of the German Society of Dermatology*, 15(4), pp. 396–403. doi: 10.1111/ddg.13221.
 - España, A. and Fernandez, S. (2017) ‘Exploring beyond the oral mucosa in patients affected with autoimmune blistering diseases: the importance of endoscopic procedures.’, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(5), pp. 791–797. doi: 10.1111/jdv.13889.
 - Esparís-Ogando, A. *et al.* (2016) ‘Targeting the EGF/HER ligand-receptor system

- in cancer.', *Current Pharmaceutical Design*, 22(39), pp. 5887–5898. doi: 10.2174/1381612822666160715132233.
- Essayem, S. *et al.* (2006) 'Hair cycle and wound healing in mice with a keratinocyte-restricted deletion of FAK.', *Oncogene*, 25(7), pp. 1081–9. doi: 10.1038/sj.onc.1209130.
 - Evangelista, F. *et al.* (2008) 'E-cadherin Is an Additional Immunological Target for Pemphigus Autoantibodies', *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), pp. 1710–1718. doi: 10.1038/sj.jid.5701260.
 - Eyre, R. W. and Stanley, J. R. (1988) 'Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen.', *Journal of Clinical Investigation*, 81(3), pp. 807–812. doi: 10.1172/JCI113387.
 - Fernández, S. *et al.* (2012) 'Study of oral, ear, nose and throat involvement in pemphigus vulgaris by endoscopic examination', *British Journal of Dermatology*, 167(5), pp. 1011–1016. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11098.x.
 - Fleischli, M. E., Valek, R. H. and Pandya, A. G. (1999) 'Pulse intravenous cyclophosphamide therapy in pemphigus.', *Archives of Dermatology*, 135(1), pp. 57–61. doi: 10.1001/archderm.135.1.57.
 - Forsberg, S. and Rollman, O. (2010) 'Re-epithelialization from human skin explant cultures is promoted by ligand-activated HER3 receptor', *Journal of Dermatological Science*, 59(1), pp. 7–15. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.03.017.
 - Frame, M. C. (2002) 'Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour.', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602(2), pp. 114–30. doi: 10.1016/s0304-419x(02)00040-9.
 - Franke, T. F., Kaplan, D. R. and Cantley, L. C. (1997) 'PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis.', *Cell*, 88(4), pp. 435–7. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81883-8.
 - Franzke, C.-W., Bruckner-Tuderman, L. and Blobel, C. P. (2009) 'Shedding of Collagen XVII/BP180 in Skin Depends on Both ADAM10 and ADAM9', *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), pp. 23386–23396. doi: 10.1074/jbc.M109.034090.

- Freudlsperger, C. *et al.* (2011) 'EGFR–PI3K–AKT–mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(1), pp. 63–74. doi: 10.1517/14728222.2011.541440.
- Frusić-Zlotkin, M. *et al.* (2006) 'Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor.', *Autoimmunity*, 39(7), pp. 563–75. doi: 10.1080/08916930600971836.
- Fujii, M. *et al.* (2011) 'Recalcitrant facial pemphigus vulgaris: correlation of skin lesions with the ratio of antidesmoglein antibodies 1 and 3.', *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(3), pp. 284–7. doi: 10.1111/j.1365-2230.2010.03920.x.
- Futei, Y. *et al.* (2001) 'Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus.', *Journal of Dermatological Science*, 26(1), pp. 55–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323221>.
- García-Rabasco, A. *et al.* (2012) 'Infliximab therapy failure in two patients with pemphigus vulgaris.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(5), pp. e196-7. doi: 10.1016/j.jaad.2011.05.029.
- Gibb, D. R. *et al.* (2011) 'The emergence of ADAM10 as a regulator of lymphocyte development and autoimmunity', *Molecular Immunology*, 48(11), pp. 1319-27. doi: 10.1016/j.molimm.2010.12.005.
- Gil, M. P. *et al.* (2012) 'Inhibition of FAK prevents blister formation in the neonatal mouse model of pemphigus vulgaris', *Experimental Dermatology*, 21(4), pp. 254–259. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01441.x.
- Gliem, M. *et al.* (2010) 'Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris.', *American Journal of Physiology. Cell physiology*, 299(3), pp. C606-13. doi: 10.1152/ajpcell.00075.2010.
- Gniadecki, R. *et al.* (1998) 'Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases.', *Archives of Dermatological Research*, 290(10), pp. 528–32. doi: 10.1007/s004030050347.

- Gonzalez, A. *et al.* (2000) 'Correlation between profile of circulating mononuclear cells and clinical manifestations in patients with pemphigus vulgaris', *Autoimmunity*, 32 (2), pp. 115–28. doi: 10.3109/08916930008994081.
- González-Escribano, M. F. *et al.* (1998) 'Distribution of HLA class II alleles among spanish patients with pemphigus vulgaris.', *Tissue Antigens*, 52(3), pp. 275–8. doi: 10.1111/j.1399-0039.1998.tb03043.x.
- Gornowicz-Porowska, J. *et al.* (2015) 'Mucosal-dominant pemphigus vulgaris in a captopril-taking woman with angioedema', *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(5), pp. 748–751. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153390.
- Grando, S. A. (2000) 'Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus', *Dermatology*, 201(4), pp. 290–295. doi: 10.1159/000051540.
- Grando, S. A. *et al.* (2001) 'Pemphigus: an unfolding story.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 117(4), pp. 990–5. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01489.x.
- Grando, S. A. (2006) 'Cholinergic control of epidermal cohesion.', *Experimental Dermatology*, 15(4), pp. 265–82. doi: 10.1111/j.0906-6705.2006.00410.x.
- Grando, S. A. *et al.* (2009) 'Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis.', *Experimental Dermatology*, 18(9), pp. 764–70. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00934.x.
- Grando, S. A., Laquer, V. T. and Le, H. M. (2011) 'Sirolimus for acute pemphigus vulgaris: a case report and discussion of dualistic action providing for both immunosuppression and keratinocyte protection.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(3), pp. 684–6. doi: 10.1016/j.jaad.2011.01.029.
- Grando, S. A. (2012) 'Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities.', *Autoimmunity*, 45(1), pp. 7–35. doi: 10.3109/08916934.2011.606444.
- Green, M. G. and Bystry, J.-C. (2008) 'Effect of intravenous immunoglobulin therapy on serum levels of IgG1 and IgG4 antidesmoglein 1 and antidesmoglein 3 antibodies in pemphigus vulgaris.', *Archives of Dermatology*, 144(12), pp. 1621–4. doi: 10.1001/archdermatol.2008.503.

- Haas, M. *et al.* (2002) '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.', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), pp. 18694–702. doi: 10.1074/jbc.M111357200.
- Hackel, P. O. *et al.* (1999) 'Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways.', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), pp. 184–9. doi: 10.1016/s0955-0674(99)80024-6.
- Harman, K. E. *et al.* (2000) 'Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3.', *Clinical and Experimental Dermatology*, 25(3), pp. 236–40. doi: 10.1046/j.1365-2230.2000.00624.x.
- Hashimoto, T. *et al.* (1995) 'A case of pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) and desmocollins.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(4), pp. 541–4. doi: 10.1111/1523-1747.ep12606050.
- Haas, M. *et al.* (2002) '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.', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), pp. 18694–702. doi: 10.1074/jbc.M111357200.
- Heinzmann, K. *et al.* (2018) 'Depicting Changes in Tumor Biology in Response to Cetuximab Monotherapy or Combination Therapy by Apoptosis and Proliferation Imaging Using 18F-ICMT-11 and 18F-FLT PET.', *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 59(10), pp. 1558–1565. doi: 10.2967/jnumed.118.209304.
- Hennerici, T. *et al.* (2016) 'Increased frequency of T follicular helper cells and elevated interleukin-27 plasma levels in patients with pemphigus.', *PloS one*, 11(2), e0148919. doi: 10.1371/journal.pone.0148919.
- Hertl, M., Eming, R. and Veldman, C. (2006) 'T cell control in autoimmune bullous skin disorders', *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), pp. 1159–1166. doi: 10.1172/JCI28547.

- Hertl, M. et al. (2015) 'Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment - guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV)', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(3), pp. 405–414. doi: 10.1111/jdv.12772.
- Heupel, W.-M. et al. (2009) 'Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor.', *The American Journal of Pathology*, 174(2), pp. 475–85. doi: 10.2353/ajpath.2009.080392.
- Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) 'ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life.', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), pp. 195–217. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440.
- Horiuchi, K. et al. (2007) 'Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx', *Molecular Biology of the Cell*, 18(1), pp. 176–188. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0014.
- Howell, S. M. et al. (2005) 'Rapid response of IgA pemphigus of the subcorneal pustular dermatosis subtype to treatment with adalimumab and mycophenolate mofetil.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(3), pp. 541–3. doi: 10.1016/j.jaad.2005.02.051.
- Hu, C. H., Michel, B. and Schiltz, J. R. (1978) 'Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study.', *The American Journal of Pathology*, 90(2), pp. 345–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/564142>.
- Huang, J. et al. (2019) 'SRC fine-tunes ADAM10 shedding activity to promote pituitary adenoma cell progression', *The FEBS Journal*, p. febs.15026. doi: 10.1111/febs.15026.
- Huovila, A.-P. J. et al. (2005) 'Shedding light on ADAM metalloproteinases', *Trends in Biochemical Sciences*, 30(7), pp. 413–422. doi: 10.1016/j.tibs.2005.05.006.
- Inoshima, I. et al. (2011) 'A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts

- the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice.', *Nature Medicine*, 17(10), pp. 1310–4. doi: 10.1038/nm.2451.
- Inoshima, N., Wang, Y. and Bubeck-Wardenburg, J. (2012) 'Genetic requirement for ADAM10 in severe *Staphylococcus aureus* skin infection.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(5), pp. 1513–6. doi: 10.1038/jid.2011.462.
 - Iraj, F. and Yoosefi, A. (2006) 'Healing effect of Pilocarpine gel 4% on skin lesions of pemphigus vulgaris.', *International Journal of Dermatology*, 45(6), pp. 743–6. doi: 10.1111/j.1365-4632.2006.02766.x.
 - Ishii, K. *et al.* (1997) 'Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins.', *Journal of Immunology*, 159(4), pp. 2010–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257868>.
 - Ishii, N. *et al.* (2015) 'Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus.', *The British Journal of Dermatology*, 173(1), pp. 59–68. doi: 10.1111/bjd.13711.
 - Ishizawa, R. and Parsons, S. J. (2004) 'c-Src and cooperating partners in human cancer.', *Cancer Cell*, 6(3), pp. 209–14. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.001.
 - Iwatsuki, K. *et al.* (1991) 'Can pemphigus vulgaris become pemphigus foliaceus?', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(5 Pt 1), pp. 797–800. doi: 10.1016/s0190-9622(08)80971-1.
 - Iwatsuki, K. *et al.* (1995) 'Differences in the expression of pemphigus antigens during epidermal differentiation.', *The British Journal of Dermatology*, 133(2), pp. 209–16. doi: 10.1111/j.1365-2133.1995.tb02617.x.
 - Janse, I. C. *et al.* (2014) 'No evidence of apoptotic cells in pemphigus acantholysis', *Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), pp. 2039–2041. doi: 10.1038/jid.2014.60.
 - Jolles, S. (2001) 'A review of high-dose intravenous immunoglobulin (hdIVIg) in the treatment of the autoimmune blistering disorders.', *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(2), pp. 127–31. doi: 10.1046/j.1365-2230.2001.00779.x.
 - Joly, P. (2010) 'Maladies bulleuses auto-immunes : des avancées spectaculaires',

- La Presse Médicale, 39(10), pp. 1040–1041. doi: 10.1016/j.lpm.2010.04.022.
- Joly, P. and Litrowski, N. (2011) 'Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis).', *Clinics in Dermatology*, 29(4), pp. 432–6. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.013.
 - Joly, P. *et al.* (2017) 'First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial.', *Lancet*, 389(10083), pp. 2031–2040. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30070-3.
 - Jones, J. T., Akita, R. W. and Sliwkowski, M. X. (1999) 'Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors.', *FEBS Letters*, 447(2–3), pp. 227–31. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00283-5.
 - Kakuta, R. *et al.* (2018) 'Azathioprine monotherapy in autoimmune blistering diseases: A feasible option for mild to moderate cases', *The Journal of Dermatology*, 45(3), pp. 334–339. doi: 10.1111/1346-8138.14173.
 - Kalantari-Dehaghi, M. *et al.* (2011) 'New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology', *Experimental Dermatology*, 20(2), pp. 154–156. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01193.x.
 - Kalanthari-Dehaghi, M. *et al.* (2013) 'Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique', *Plos One*, 8(3), e5758. doi: 10.1371/journal.pone.0057587.
 - Kalanthari-Dehaghi, M. *et al.* (2013) 'Mechanisms of mitochondrial damage in keratinocytes by pemphigus vulgaris antibodies', *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), pp. 16916–16925. doi: 10.1074/jbc.M113.472100.
 - Kalish, R. S. (2001) 'Possible role for non-desmoglein antigen in pemphigus.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 117(4), p. 995. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01489-3.x.
 - Kamiya, K. *et al.* (2016) 'Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3', *The Journal of Dermatology*, 43(4), pp. 429–431. doi: 10.1111/1346-8138.13086.
 - Kárpáti, S. *et al.* (1993) 'Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of

- cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes.', *The Journal of Cell Biology*, 122(2), pp. 409–15. doi: 10.1083/jcb.122.2.409.
- Kavala, M. *et al.* (2012) 'The evaluation of thyroid diseases in patients with pemphigus vulgaris', *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 1–4. doi: 10.1100/2012/146897.
 - Kawana, S. *et al.* (1994) 'Changes in clinical features, histologic findings, and antigen profiles with development of pemphigus foliaceus from pemphigus vulgaris.', *Archives of Dermatology*, 130(12), pp. 1534–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986127>.
 - Kawaguchi, M., Mitsuhashi, Y. and Kondo, S. (2005) 'Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis', *British Journal of Dermatology*, 152(5), pp. 915–919. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06440.x.
 - Kawasaki, H. *et al.* (2006) 'Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 igg antibodies on pemphigus vulgaris blister formation', *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), pp. 2621–2630. doi: 10.1038/sj.jid.5700450.
 - Khezri, S. *et al.* (2013) 'Anal involvement in pemphigus vulgaris', *Autoimmune Diseases*, 2013, pp. 1–4. doi: 10.1155/2013/609181.
 - Kiguchi, K. *et al.* (2000) 'Constitutive expression of erbB2 in epidermis of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and spontaneous skin tumor development.', *Oncogene*, 19(37), pp. 4243–54. doi: 10.1038/sj.onc.1203778.
 - King I.A. *et al.* (1995) 'The desmocollin of human foreskin epidermis: identification and chromosomal assignment of a third gene and expression pattern of the three isoforms'. *Journal of Investigative Dermatology*, 105(3), pp. 314-21. doi: 10.1111/1523-1747.ep12319935.
 - Kitajima, Y., Inoue, S. and Yaoita, H. (1986) 'Effects of pemphigus antibody on the organization of microtubules and keratin-intermediate filaments in cultured human keratinocytes.', *The British Journal of Dermatology*, 114(2), pp. 171–9. doi: 10.1111/j.1365-2133.1986.tb02795.x.

- Kitajima, Y., Aoyama, Y. and Seishima, M. (1999) '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.', *The journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 4(2), pp. 137-44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536988>.
- Kitajima, Y. and Aoyama, Y. (2007) 'A perspective of pemphigus from bedside and laboratory-bench.', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 33(1-2), pp. 57-66. doi: 10.1007/s12016-007-0036-5.
- Kitajima, Y. (2013) 'New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease', *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(1), pp. 1-13. doi: 10.1016/j.kjms.2012.08.001.
- Kitazumi, I. and Tsukahara, M. (2011) 'Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation.', *The FEBS Journal*, 278(3), pp. 427-41. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07975.x.
- Klapper, L. N. *et al.* (2000) 'Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors.', *Advances in Cancer Research*, 77, pp. 25-79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549355>.
- Klymkowsky, M. W. *et al.* (1999) 'Membrane-anchored plakoglobins have multiple mechanisms of action in Wnt signaling.', *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), pp. 3151-69. doi: 10.1091/mbc.10.10.3151.
- Koch, P. J. *et al.* (1997) '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.', *The Journal of Cell Biology*, 137(5), pp. 1091-102. doi: 10.1083/jcb.137.5.1091.
- Korman, N. J. *et al.* (1989) 'Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris.', *The New England Journal of Medicine*, 321(10), pp. 631-5. doi: 10.1056/NEJM198909073211002.
- Kowalczyk, A. P., Borgwardt, J. E. and Green, K. J. (1996) 'Analysis of desmosomal

- cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 107(3), pp. 293–300. doi: 10.1111/1523-1747.ep12363000.
- Kricheli, D. *et al.* (2000) 'The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives.', *The British Journal of Dermatology*, 143(2), pp. 337–42. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03659.x.
 - Kridin, K. (2018a) 'Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris', *Therapeutics and Clinical Risk Management*, Volume 14, pp. 757–778. doi: 10.2147/TCRM.S142471.
 - Kridin, K. (2018b) 'Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities', *Immunologic Research*, 66(2), pp. 255–270. doi: 10.1007/s12026-018-8986-7.
 - Kridin, K., Zelber-Sagi, S. and Bergman, R. (2018) 'Risk factors for lethal outcome in patients with pemphigus: a retrospective cohort study.', *European Journal of Dermatology*, 28(1), pp. 26–37. doi: 10.1684/ejd.2018.3252.
 - Kridin, K. *et al.* (2019) 'Treatment update of autoimmune blistering diseases.', *Dermatologic Clinics*, 37(2), pp. 215–228. doi: 10.1016/j.det.2018.12.003.
 - Kugelmann, D. *et al.* (2019) 'Role of Src and cortactin in pemphigus skin blistering.', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 626. doi: 10.3389/fimmu.2019.00626.
 - Lakshmi MJD *et al* (2017) 'Correlation of antimuscarinic acetylcholine receptor antibody titers and anti-desmoglein antibody titers with the severity of disease in patients with pemphigus' *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76, pp. 895-902. doi: 10.1016/j.jaad.2016.11.039.
 - Lanza, A. *et al.* (2006) 'How does acantholysis occur in pemphigus vulgaris: a critical review.', *Journal of Cutaneous Pathology*, 33(6), pp. 401–12. doi: 10.1111/j.0303-6987.2006.00523.x.
 - Lanza, A. *et al.* (2011) 'Deregulation of PERK in the autoimmune disease pemphigus vulgaris occurs via IgG-independent mechanisms.', *The British*

- Journal of Dermatology, 164(2), pp. 336–43. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10084.x.
- Le Gall, S. M. *et al.* (2009) 'ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor, L-selectin, and tumor necrosis factor', *Molecular Biology of the Cell*, 20(6), pp. 1785-94. doi: 10.1091/mbc.E08-11-1135.
 - Lee, H. E. *et al.* (2009) 'Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis.', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(18), pp. 12524–32. doi: 10.1074/jbc.M808204200.
 - Lee, S. H., Hong, W. J. and Kim, S.-C. (2017) 'Analysis of serum cytokine profile in pemphigus.', *Annals of Dermatology*, 29(4), pp. 438–445. doi: 10.5021/ad.2017.29.4.438.
 - Legan, P. K. *et al.* (1994) 'The bovine desmocollin family: a new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation.', *The Journal of Cell Biology*, 126(2), pp. 507–18. doi: 10.1083/jcb.126.2.507.
 - Leshem, Y. A. *et al.* (2014) 'A prospective study on clinical response and cell-mediated immunity of pemphigus patients treated with rituximab', *Archives of Dermatological Research*, 306(1), pp. 67–74. doi: 10.1007/s00403-013-1355-4.
 - Lever, W. F. (1953) 'Pemphigus.', *Medicine*, 32(1), pp. 1–123. doi: 10.1097/00005792-195302000-00001.
 - Li, S. Y., Mruk, D. D. and Cheng, C. Y. (2013) 'Focal adhesion kinase is a regulator of F-actin dynamics', *Spermatogenesis*, 3(3), p. e25385. doi: 10.4161/spmg.25385.
 - Lin, M. S. *et al.* (1997) 'T lymphocytes from a subset of patients with pemphigus vulgaris respond to both desmoglein-3 and desmoglein-1.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 109(6), pp. 734–7. doi: 10.1111/1523-1747.ep12340738.
 - Liu, P. C. C. *et al.* (2006) 'Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells.', *Cancer Biology & Therapy*, 5(6), pp. 657–64. doi: 10.4161/cbt.5.6.2708.

- Liu, W. *et al.* (2008) 'FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells.', *Carcinogenesis*, 29(6), pp. 1096–107. doi: 10.1093/carcin/bgn026.
- Loiseau, P. *et al.* (2000) 'HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.', *Journal of Autoimmunity*, 15(1), pp. 67–73. doi: 10.1006/jaut.2000.0388.
- LoPiccolo, J. *et al.* (2008) 'Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations.', *Drug Resistance Updates*, 11(1–2), pp. 32–50. doi: 10.1016/j.drug.2007.11.003.
- Lorch, J. H. *et al.* (2004) 'Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells.', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), pp. 37191–200. doi: 10.1074/jbc.M405123200.
- Lotti, R., Marconi, A. and Pincelli, C. (2012) 'Apoptotic pathways in the pathogenesis of pemphigus: targets for new therapies.', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(10), pp. 1877–81. doi: 10.2174/138920112802273236.
- Luyet, C. *et al.* (2015) 'Preclinical studies identify non-apoptotic low-level caspase-3 as therapeutic target in pemphigus vulgaris.', *PloS One*, 10(3), p. e0119809. doi: 10.1371/journal.pone.0119809.
- Lyons, C. R. (1995) 'The role of nitric oxide in inflammation.', *Advances in immunology*, 60, pp. 323–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8607373>.
- Mahoney, M. G. *et al.* (1999) 'Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris.', *The Journal of Clinical Investigation*, 103(4), pp. 461–8. doi: 10.1172/JCI5252.
- Mahoney, M. G., Wang, Z. H. and Stanley, J. R. (1999) 'Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice', *Journal of Investigative Dermatology*, 113(1), pp. 22–25. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00632.x.
- Mahoney, M. G. *et al.* (2006) 'Delineation of diversified desmoglein distribution in

- stratified squamous epithelia: implications in diseases.', *Experimental Dermatology*, 15(2), pp. 101–9. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00391.x.
- Makino, T. *et al.* (2015) 'Detection of IgG antibodies to desmoglein 3 and desmocollins 2 and 3 in mucosal dominant-type pemphigus vulgaris with severe pharyngalgia and hyperemia of the bulbar conjunctiva', *European Journal of Dermatology*, 25(6), pp. 619–620. doi: 10.1684/ejd.2015.2646.
 - Malik, M. and Ahmed, A. R. (2005) 'Involvement of the female genital tract in pemphigus vulgaris', *Obstetrics & Gynecology*, 106(5, Part 1), pp. 1005–1012. doi: 10.1097/01.AOG.0000185258.74177.91.
 - Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007) 'AKT/PKB signaling: navigating downstream', *Cell*, 129(7), pp. 1261–1274. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
 - Mao, X. *et al.* (2010) 'Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris', *The American Journal of Pathology*, 177(6), pp. 2724–2730. doi: 10.2353/ajpath.2010.100483.
 - Marchenko, S. *et al.* (2010) 'Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology.', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(6), pp. 3695–704. doi: 10.1074/jbc.M109.081570.
 - Maretzky, T. *et al.* (2008) 'ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), pp. 1737–46. doi: 10.1038/sj.jid.5701242.
 - Maretzky, T. *et al.* (2011) 'A transforming Src mutant increases the bioavailability of EGFR ligands via stimulation of the cell-surface metalloproteinase ADAM17', *Oncogene*, 30(5), pp. 611–8. doi: 10.1038/onc.2010.443.
 - Marmor, M. D., Skaria, K. B. and Yarden, Y. (2004) 'Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors', *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 58(3), pp. 903–913. doi: 10.1016/j.ijrobp.2003.06.002.
 - Marquina, M. *et al.* (2008) 'The role of nitric oxide synthases in pemphigus vulgaris in a mouse model.', *The British Journal of Dermatology*, 159(1), pp. 68–

76. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08582.x.

- Martin, L. K. and Murrell, D. F. (2011) 'Pemphigus: Directions for the future.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(5), pp. 909–10. doi: 10.1016/j.jaad.2010.06.003.
- Mascaró, J. M. *et al.* (1997) 'Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence.', *Clinical Immunology and Immunopathology*, 85(1), pp. 90–6. doi: 110.1006/clin.1997.4408.
- Matthews, A. L. *et al.* (2017) 'Scissor sisters: regulation of ADAM10 by the TspanC8 tetraspanins', *Biochemical Society Transactions*, 45(3), pp. 719–730. doi: 10.1042/BST20160290.
- Mavropoulos, A. *et al.* (2013) 'p38MAPK signaling in pemphigus: implications for skin autoimmunity.', *Autoimmune Diseases*, 2013, p. 728529. doi: 10.1155/2013/728529.
- Mays, J. W. *et al.* (2019) 'World Workshop of Oral Medicine VII: A systematic review of immunobiologic therapy for oral manifestations of pemphigoid and pemphigus.', *Oral Diseases*, 25 Suppl 1, pp. 111–121. doi: 10.1111/odi.13083.
- Mejri, K. *et al.* (2011) 'Spectrum of autoantibodies other than anti-desmoglein in pemphigus patients', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(7), pp. 774–781. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03859.x.
- Mendelson, K. *et al.* (2010) 'Stimulation of platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFR β and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways', *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), pp. 25024–25032. doi: 10.1074/jbc.M110.102566.
- Mentink, L. F. *et al.* (2006) 'Randomized controlled trial of adjuvant oral dexamethasone pulse therapy in pemphigus vulgaris: PEMPULS trial.', *Archives of Dermatology*, 142(5), pp. 570–6. doi: 10.1001/archderm.142.5.570.
- Merchant, N. B. *et al.* (2008) 'TACE/ADAM-17: A component of the epidermal growth factor receptor axis and a promising therapeutic target in colorectal cancer', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1216.

- de Messias-Reason, I. J., Nisihara, R. M. and Mocelin, V. (2011) 'Mannan-binding lectin and ficolin deposition in skin lesions of pemphigus.', *Archives of Dermatological Research*, 303(7), pp. 521–5. doi: 10.1007/s00403-011-1132-1.
- Mian, M. F. *et al.* (2008) 'Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis.', *Chemico-biological Interactions*, 171(1), pp. 57–66. doi: 10.1016/j.cbi.2007.08.009.
- Mignogna, M. D. *et al.* (2001) 'Catenin dislocation in oral pemphigus vulgaris.', *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 30(5), pp. 268–74. doi: 10.1034/j.1600-0714.2001.300503.x.
- Mimouni, D. *et al.* (2004) 'Mucosal dominant pemphigus vulgaris with anti-desmoplakin autoantibodies.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(1), pp. 62–7. doi: 10.1016/j.jaad.2003.11.051.
- Mindorf, S. *et al.* (2017) 'Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus.', *Experimental Dermatology*, 26(12), pp. 1267–1270. doi: 10.1111/exd.13409.
- Mócsai, A. *et al.* (1999) 'Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck.', *Journal of Immunology (Baltimore)*, 162(2), pp. 1120–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916742>.
- Moss, M. L. *et al.* (2008) 'ADAM10 as a Target for Anti-Cancer Therapy', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, pp. 2–8. doi: 10.2174/138920108783497613.
- Müller, E. J. *et al.* (2008) 'Outside-in signaling through integrins and cadherins: A central mechanism to control epidermal growth and differentiation? ', *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(3), pp. 501–16. doi: 10.1038/sj.jid.5701248.
- Müller, R. *et al.* (2008) 'IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris.', *Experimental Dermatology*, 17(1), pp. 35–43. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00615.x.
- Müller, R. *et al.* (2009) 'Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus.', *Clinical and Experimental Dermatology*, 34(8), pp. 898–903.

doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03241.x.

- Murphy, G. (2009) 'Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the "Sheddases"', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(2), pp. 138-45. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.09.004.
- Murrell, D. F. and Sprecher, E. (2017) 'Rituximab and short-course prednisone as the new gold standard for new-onset pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus', *British Journal of Dermatology*, 177(5), pp. 1143–1144. doi: 10.1111/bjd.15947.
- Mutasim, D. F. and Adams, B. B. (2001) 'Immunofluorescence in dermatology.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(6), pp. 803-22; quiz 822–4. doi: 10.1067/mjd.2001.117518.
- Mutasim, D. F. (2004) 'Management of autoimmune bullous diseases: Pharmacology and therapeutics', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(6), pp. 859–877. doi: 10.1016/j.jaad.2004.02.013.
- Muthuswamy, S. K., Gilman, M. and Brugge, J. S. (1999) 'Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers.', *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), pp. 6845–57. doi: 10.1128/mcb.19.10.6845.
- Nagasaka, T. *et al.* (2004) 'Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome.', *The Journal of Clinical Investigation*, 114(10), pp. 1484–92. doi: 10.1172/JCI20480.
- Ndoye, A. *et al.* (1998) 'Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 111(3), pp. 410–6. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00299.x.
- Nguyen, V. T., Ndoye, A. and Grando, S. A. (2000) 'Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin', *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), pp. 29466–29476. doi: 10.1074/jbc.M003174200.
- Nguyen, V. T., Ndoye, A. and Grando, S. A. (2000) 'Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by

- Pemphigus vulgaris autoimmunity.', *The American Journal of Pathology*, 157(4), pp. 1377–91. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64651-2.
- Nguyen, V. T. *et al.* (2000) 'Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions', *Journal of Clinical Investigation*, 106(12), pp. 1467–1479. doi: 10.1172/JCI10305.
 - Nguyen, V. T., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., *et al.* (2004) 'Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists', *Archives of Dermatology*, 140(3), pp. 327–34. doi: 10.1001/archderm.140.3.327.
 - Nguyen, V. T., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., *et al.* (2004) 'Pemphigus vulgaris IgG and methylprednisolone exhibit reciprocal effects on keratinocytes.', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(3), pp. 2135–46. doi: 10.1074/jbc.M309000200.
 - Nguyen, V. T., Chernyavsky, A. I., *et al.* (2004) 'Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes.', *Experimental Cell Research*, 294(2), pp. 534–49. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.12.010.
 - Nguyen, B. *et al.* (2009) 'Loss of the desmosomal protein PERP enhances the phenotypic effects of pemphigus vulgaris autoantibodies.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), pp. 1710–8. doi: 10.1038/jid.2008.419.
 - Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1997) 'Caspases: Killer proteases.', *Trends in Biochemical Sciences*, 22(8), pp. 299–306. doi: 10.1016/s0968-0004(97)01085-2.
 - O'Shaughnessy, R. F. L. *et al.* (2007) 'AKT-dependent HspB1 (Hsp27) activity in epidermal differentiation.', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(23), pp. 17297–305. doi: 10.1074/jbc.M610386200.
 - Ohzono, A. *et al.* (2015) 'Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus', *British Journal of Dermatology*, 173(6), pp. 1447–1452. doi: 10.1111/bjd.14162.
 - Oktarina, D. A. M. *et al.* (2011) 'IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion

- hypothesis.', *The British Journal of Dermatology*, 165(3), pp. 552–62. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10463.x.
- Öktem, A. *et al.* (2018) 'Evaluation of the importance of immunological profile for pemphigus vulgaris in the light of necessity to modify compensation theory.', *Acta Dermatovenerologica Croatica*, 26(2), pp. 100–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29989864>.
 - Olayioye, M. A. *et al.* (2000) 'The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.', *The EMBO Journal*, 19(13), pp. 3159–67. doi: 10.1093/emboj/19.13.3159.
 - Otten, J. V *et al.* (2014) 'Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions.', *Current Molecular Medicine*, 14(1), pp. 69–95. doi: 10.2174/15665240113136660079.
 - Owens, D. W. *et al.* (2000) 'The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts.', *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), pp. 51–64. doi: 10.1091/mbc.11.1.51.
 - Pan, M., Liu, X. and Zheng, J. (2011) 'The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris.', *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(7), pp. 703–7. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04092.x.
 - Pan, Y. *et al.* (2012) 'ADAM10 promotes pituitary adenoma cell migration by regulating cleavage of CD44 and L1', *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(1), pp. 21–33. doi: 10.1530/JME-11-0174.
 - Payne, A. S. *et al.* (2005) 'Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display', *Journal of Clinical Investigation*, 115(4), pp. 888–899. doi: 10.1172/JCI24185.
 - Pelacho, B. *et al.* (2004) 'Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes.', *FEBS Letters*, 566(1–3), pp. 6–10. doi: 10.1016/j.febslet.2004.03.107.
 - Pretel, M. *et al.* (2009) 'An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris.', *Experimental Dermatology*, 18(9), pp. 771–80. doi: 10.1111/j.1600-

0625.2009.00893.x.

- Pollmann, R. *et al.* (2018) 'Pemphigus: a comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches.', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 54(1), pp. 1–25. doi: 10.1007/s12016-017-8662-z.
- Puviani, M. *et al.* (2003) 'Fas Ligand in Pemphigus Sera Induces Keratinocyte Apoptosis through the Activation of Caspase-8', *Journal of Investigative Dermatology*, 120(1), pp. 164–167. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12014.x.
- Qian, Y. *et al.* (2007) 'Dissecting the anti-desmoglein autoreactive B cell repertoire in pemphigus vulgaris patients.', *Journal of Immunology (Baltimore)*, 178(9), pp. 5982–90. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5982.
- Quadri, S. K. (2012) 'Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: role in regulating endothelial barrier function.', *Microvascular Research*, 83(1), pp. 3–11. doi: 10.1016/j.mvr.2011.08.001.
- Rafei, D. *et al.* (2011) 'IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion', *The American Journal of Pathology*, 178(2), pp. 718–723. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.10.016.
- Ratnam, K. V, Phay, K. L. and Tan, C. K. (1990) 'Pemphigus therapy with oral prednisolone regimens. A 5-year study.', *International Journal of Dermatology*, 29(5), pp. 363–7. doi: 10.1111/j.1365-4362.1990.tb04765.x.
- Reis, V. M. *et al.* (2000) 'UVB-induced acantholysis in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem) and Pemphigus vulgaris.', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(4), pp. 571–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727300>.
- Renkl, A. *et al.* (2004) 'A novel therapeutic option in pemphigus vulgaris: humanized monoclonal anti-CD25 antibody.', *The British Journal of Dermatology*, 150(6), pp. 1220–2. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05977.x.
- Risser, J., Lewis, K. and Weinstock, M. A. (2009) 'Mortality of bullous skin disorders from 1979 through 2002 in the United States.', *Archives of Dermatology*, 145(9), pp. 1005–8. doi: 10.1001/archdermatol.2009.205.
- Rose-John, S. (2013) 'ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets',

- Pharmacological Research, 71, pp. 19-22. doi: 10.1016/j.phrs.2013.01.012.
- Roskoski, R. (2014) 'The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer', *Pharmacological Research*, 79, pp. 34-74. doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.
 - Rötzer, V. *et al.* (2014) 'Adducin Is Required for Desmosomal Cohesion in Keratinocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), pp. 14925-14940. doi: 10.1074/jbc.M113.527127.
 - Rötzer, V. *et al.* (2015) 'E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion.', *Cellular and Molecular Life* 72(24), pp. 4885-97. doi: 10.1007/s00018-015-1977-0.
 - Ruiz, P. *et al.* (1996) 'Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart.', *The Journal of Cell Biology*, 135(1), pp. 215-25. doi: 10.1083/jcb.135.1.215.
 - Ruocco, E. *et al.* (2005) 'Life-threatening bullous dermatoses: Pemphigus vulgaris', *Clinics in Dermatology*, 23(3), pp. 223-226. doi: 10.1016/j.clindermatol.2004.06.015.
 - Ruocco, E. *et al.* (2014) 'Viruses and pemphigus: an intriguing never-ending story', *Dermatology*, 229(4), pp. 310-315. doi: 10.1159/000365845.
 - Saftig, P. and Reiss, K. (2011) 'The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential?', *European Journal of Cell Biology*, 90(6-7), pp. 527-35. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.11.005.
 - Saha, M. *et al.* (2010) 'Pemphigus vulgaris in white europeans is linked with HLA Class II allele HLA DRB1*1454 but not DRB1*1401', *Journal of Investigative Dermatology*, 130(1), pp. 311-314. doi: 10.1038/jid.2009.241.
 - Sahin, U. *et al.* (2004) 'Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200307137.
 - Saito, M. *et al.* (2012) 'Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation', *PLoS ONE*, 7(12), p. e50696. doi: 10.1371/journal.pone.0050696.

- Sajda, T. *et al.* (2016) 'Multiplexed autoantigen microarrays identify HLA as a key driver of anti-desmoglein and -non-desmoglein reactivities in pemphigus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), pp. 1859–64. doi: 10.1073/pnas.1525448113.
- Sajda, T. and Sinha, A. A. (2018) 'Autoantibody signaling in pemphigus vulgaris: development of an integrated model.', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 692. doi: 10.3389/fimmu.2018.00692.
- Salato, V. K. *et al.* (2005) 'Role of intramolecular epitope spreading in pemphigus vulgaris', *Clinical Immunology*, 116(1), pp. 54–64. doi: 10.1016/j.clim.2005.03.005.
- Sami, N. and Ahmed, A. R. (2001) 'Penile pemphigus.', *Archives of dermatology*, 137(6), pp. 756–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11405766>.
- Sanath, A. K. *et al.* (2018) 'Caspase cascade pathways of apoptosis in oral pemphigus: An immunohistochemical study.', *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(1), pp. 48–53. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_79_17.
- Sánchez-Carpintero, I. *et al.* (2004) 'In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades.', *The British Journal of Dermatology*, 151(3), pp. 565–70. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.06147.x.
- Sanchez, J. *et al.* (2018) 'Rituximab as single long-term maintenance therapy in patients with difficult-to-treat pemphigus', *JAMA Dermatology*, 154(3), p. 363. doi: 10.1001/jamadermatol.2017.5176.
- Sato, K. (2013) 'Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp. 10761–10790. doi: 10.3390/ijms140610761.
- Satyam, A. *et al.* (2009) 'Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris.', *Immunological Investigations*, 38(6), pp. 498–509. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19811408>.

- Schaefer, B. M., Jaeger, C. J. and Kramer, M. D. (1996) 'Plasminogen activator system in pemphigus vulgaris.', *The British Journal of Dermatology*, 135(5), pp. 726–32. doi: 10.1111/j.1365-2133.1996.tb03881.x.
- Schäfer, S., Koch, P. J. and Franke, W. W. (1994) 'Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins.', *Experimental Cell Research*, 211(2), pp. 391–9. doi: 10.1006/excr.1994.1103.
- Schmidt, E. *et al.* (2009) 'Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(1), pp. C162–C172. doi: 10.1152/ajpcell.00161.2008.
- Schmidt, E. and Waschke, J. (2009) 'Apoptosis in pemphigus', *Autoimmunity Reviews*, 8(7), pp. 533–537. doi: 10.1016/j.autrev.2009.01.011.
- Scholz, F. *et al.* (2007) 'Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin', *Journal of Investigative Dermatology*, 127(6), pp. 1444–1455. doi: 10.1038/sj.jid.5700751.
- Schulz, B. *et al.* (2008) 'ADAM10 regulates endothelial permeability and T-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin', *Circulation Research*, 102(10), pp. 1192–1201. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.169805.
- Schultz, H. Y. (2011) 'Scientific highlights from the 71st Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), pp. 1963–7. doi: 10.1038/jid.2011.244.
- Schumann, H. *et al.* (2000) 'The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases.', *The American Journal of Pathology*, 156(2), pp. 685–95. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64772-4.
- Seishima, M. *et al.* (1997) 'Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes', *Journal of Investigative Dermatology*, 109(5), pp. 650–655. doi: 10.1111/1523-1747.ep12337662.
- Sekulić, A. *et al.* (2000) 'A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-

- AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells.', *Cancer Research*, 60(13), pp. 3504–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910062>.
- Serrels, B. *et al.* (2009) 'A novel Src kinase inhibitor reduces tumour formation in a skin carcinogenesis model.', *Carcinogenesis*, 30(2), pp. 249–57. doi: 10.1093/carcin/bgn278.
 - Sharma, P., Mao, X. and Payne, A. S. (2007) 'Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus.', *Journal of Dermatological Science*, 48(1), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.05.005.
 - Shetty, A. *et al.* (2009) 'Successful treatment of pemphigus vulgaris with etanercept in four patients.', *Journal of Drugs in Dermatology*, 8(10), pp. 940–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852124>.
 - Shimizu, A. *et al.* (2004) 'IgG binds to desmoglein 3 in desmosomes and causes a desmosomal split without keratin retraction in a pemphigus mouse model.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(5), pp. 1145–53. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22426.x.
 - Shirakata, Y. *et al.* (1998) 'Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 110(1), pp. 76–8. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00085.x.
 - Siebra, M. X. *et al.* (2006) 'Evidence for the participation of nitric oxide in pemphigus.', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(5), pp. 671–5. doi: /S0100-879X2006000500014.
 - Sinha, A. A., Hoffman, M. B. and Janicke, E. C. (2015) 'Pemphigus vulgaris: approach to treatment.', *European Journal of Dermatology*, 25(2), pp. 103–13. doi: 10.1684/ejd.2014.2483.
 - Sinha, A. A., Hoffman, M. B. and Janicke, E. C. (2015) 'Pemphigus vulgaris: approach to treatment.', *European Journal of Dermatology*, 25(2), pp. 103–13. doi: 10.1684/ejd.2014.2483.
 - Sinha, A. A. and Sajda, T. (2018) 'The evolving story of autoantibodies in pemphigus vulgaris: development of the “super compensation hypothesis”',

Frontiers in Medicine, 5, p. 218. doi: 10.3389/fmed.2018.00218.

- Simrak, D. *et al.* (1995) 'Tandem arrangement of the closely linked desmoglein genes on human chromosome 18.', *Genomics*, 25(2), pp. 591–4. doi: 110.1016/0888-7543(95)80067-v.
- Sitaru, C. and Zillikens, D. (2005) 'Mechanisms of blister induction by autoantibodies', *Experimental Dermatology*, 14(12), pp. 861–875. doi: 10.1111/j.1600-0625.2005.00367.x.
- Smith, E. A. and Fuchs, E. (1998) 'Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes.', *The Journal of Cell Biology*, 141(5), pp. 1229–41. doi: 10.1083/jcb.141.5.1229.
- Solanas, G. *et al.* (2011) 'Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2298.
- Spaeth, S. *et al.* (2001) 'IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris.', *The British Journal of Dermatology*, 144(6), pp. 1183–8. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04228.x.
- Spinardi, L. and Marchisio, P. C. (2006) 'Podosomes as smart regulators of cellular adhesion.', *European Journal of Cell Biology*, 85(3–4), pp. 191–4. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.08.005.
- Spindler, V. *et al.* (2009) 'Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus.', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(44), pp. 30556–64. doi: 10.1074/jbc.M109.024810.
- Spindler, V. and Waschke, J. (2011) 'Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis', *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 193(3), pp. 177–180. doi: 10.1016/j.aanat.2011.02.003.
- Spindler, V. *et al.* (2014) 'Plakoglobin but Not Desmoplakin Regulates Keratinocyte Cohesion via Modulation of p38MAPK Signaling', *Journal of Investigative Dermatology*, 134(6), pp. 1655–1664. doi: 10.1038/jid.2014.21.
- Spindler, V. and Waschke, J. (2018) 'Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms.', *Frontiers in Immunology*, 9, p.

136. doi: 10.3389/fimmu.2018.00136.

- Stanley, J. R. *et al.* (1982) 'Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes.', *The Journal of Clinical Investigation*, 70(2), pp. 281–8. doi: 10.1172/jci110615.
- Stanley, J. R., Koulu, L. and Thivolet, C. (1984) 'Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies.', *The Journal of Clinical Investigation*, 74(2), pp. 313–20. doi: 10.1172/JCI111426.
- Stern, J. N. H. *et al.* (2008) 'Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris - preliminary observations.', *Clinical and Experimental Immunology*, 152(3), pp. 472–81. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03638.x.
- Stieger, M. *et al.* (2013) 'Penile erosions as first manifestation of pemphigus vulgaris: a misleading presentation', *Acta Dermato Venereologica*, 93(2), pp. 248–249. doi: 10.2340/00015555-1388.
- Sun, X., Fu, X. and Sheng, Z. (2007) 'Cutaneous stem cells: something new and something borrowed', *Wound Repair and Regeneration*, 15(6), pp. 775–785. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00282.x.
- Takahashi, H. *et al.* (2008) 'Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris.', *Journal of Immunology (Baltimore)*, 181(2), pp. 1526–35. doi: 10.4049/jimmunol.181.2.1526.
- Takahashi, H. *et al.* (2011) 'Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice.', *The Journal of Clinical Investigation*, 121(9), pp. 3677–88. doi: 10.1172/JCI57379.
- Takashima, A. *et al.* (1996) 'Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta', *Neuroscience Letters*, 203(1), pp. 33–6. doi: 10.1016/0304-3940(95)12257-5.
- Tatton, L. *et al.* (2003) 'The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases.', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7), pp. 4847–53. doi: 10.1074/jbc.M209321200.

- Tavakolpour, S. and Tavakolpour, V. (2016) 'Interleukin 4 inhibition as a potential therapeutic in pemphigus', *Cytokine*, 77, pp. 189–195. doi: 10.1016/j.cyto.2015.09.017.
- Tavakolpour, S. (2017) 'Current and future treatment options for pemphigus: Is it time to move towards more effective treatments?', *International Immunopharmacology*, 53, pp. 133–142. doi: 10.1016/j.intimp.2017.10.027.
- Tavakolpour, S., Mirsafaei, H. S. and Delshad, S. (2017) 'Management of pemphigus disease in pregnancy', *American Journal of Reproductive Immunology*, 77(1), p. e12601. doi: 10.1111/aji.12601.
- Tavakolpour, S. *et al.* (2018) 'Sixteen-year history of rituximab therapy for 1085 pemphigus vulgaris patients: A systematic review.', *International Immunopharmacology*, 54, pp. 131–138. doi: 10.1016/j.intimp.2017.11.005.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008) 'Apoptosis: controlled demolition at the cellular level', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), pp. 231–241. doi: 10.1038/nrm2312.
- Thomas, S. M. and Brugge, J. S. (1997) 'Cellular functions regulated by src family kinases', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), pp. 513–609. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.513.
- Toosi, S. *et al.* (2011) 'Serum levels of inhibitors of apoptotic proteins (IAPs) change with IVIg therapy in pemphigus.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(11), pp. 2327–9. doi: 10.1038/jid.2011.184.
- Torzecka, J. D. *et al.* (2007) 'Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development?', *Archives of Dermatological Research*, 299(5–6), pp. 239–43. doi: 10.1007/s00403-007-0760-y.
- Toto, P. *et al.* (2000) 'Immune modulation in pemphigus vulgaris: role of CD28 and IL-10.', *Journal of Immunology (Baltimore)*, 164(1), pp. 522–9. doi: 10.4049/jimmunol.164.1.522.
- Tsang, S. M. *et al.* (2010) 'Desmoglein 3, via an Interaction with E-cadherin, Is Associated with Activation of Src', *PLoS ONE*, 5(12), p. e14211. doi:

10.1371/journal.pone.0014211.

- Tsukita, S. *et al.* (1991) 'Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated.', *The Journal of Cell Biology*, 113(4), pp. 867–79. doi: 10.1083/jcb.113.4.867.
- Tsunoda, K. *et al.* (2003) 'Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3', *Journal of Immunology (Baltimore)*, 170(4), pp. 2170–8. doi: 10.4049/jimmunol.170.4.2170.
- Tsunoda, K. *et al.* (2011) 'Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris.', *The American Journal of Pathology*, 179(2), pp. 795–806. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.015.
- Turner, M. S., Sutton, D. and Sauder, D. N. (2000) 'The use of plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of pemphigus vulgaris', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(6), pp. 1058–1064. doi: 10.1067/mjd.2000.109297.
- Tzahar, E. *et al.* (1994) 'ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/herregulin isoforms.', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(40), pp. 25226–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929212>.
- Ueki, H. *et al.* (2001) 'Antidesmoglein autoantibodies in silicosis patients with no bullous diseases.', *Dermatology (Switzerland)*, 202(1), pp. 16–21. doi: 10.1159/000051578.
- Ugajin, T. *et al.* (2007) 'Two siblings with neonatal pemphigus vulgaris associated with mild maternal disease.', *The British Journal of Dermatology*, 157(1), pp. 192–4. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07927.x.
- Ujiie, I. *et al.* (2019) 'Clinical and immunological features of pemphigus relapse.', *The British Journal of Dermatology*, 180(6), pp. 1498–1505. doi: 10.1111/bjd.17591.
- van Beek, N., Zillikens, D. and Schmidt, E. (2019) 'Aktuelle therapie des

- pemphigus', *Der Hautarzt*, 70(4), pp. 243–253. doi: 10.1007/s00105-019-4385-9.
- Vinay, K. *et al.* (2018) 'Rituximab as first-line adjuvant therapy for pemphigus: Retrospective analysis of long-term outcomes at a single center', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(4), pp. 806–808. doi: 10.1016/j.jaad.2017.11.024.
 - Vu, T. N. *et al.* (1998) 'The pathophysiological significance of non-desmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.', *Archives of Dermatology*, 134(8), pp. 971–80. doi:10.1001/archderm.134.8.971.
 - Vullhorst, D. and Buonanno, A. (2019) 'NMDA Receptors regulate neuregulin 2 binding to ER-PM junctions and ectodomain release.', *Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-019-01659-w.
 - Walter, E. *et al.* (2017) 'Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus.', *Scientific Reports*, 7(1), p. 3579. doi: 10.1038/s41598-017-03697-7.
 - Walter, E. *et al.* (2019) 'Role of Dsg1- and Dsg3-mediated signaling in pemphigus autoantibody-induced loss of keratinocyte cohesion.', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 1128. doi: 10.3389/fimmu.2019.01128.
 - Wang, X. *et al.* (2004) 'Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins', *Apoptosis*, 9(2), pp. 131–143. doi: 10.1023/B:APPT.0000018795.05766.1f.
 - Waschke, J. *et al.* (2005) 'Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction', *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), pp. 3157–3165. doi: 10.1172/JCI23475.
 - Waschke, J. *et al.* (2006) 'Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering.', *The Journal of Cell Biology*, 175(5), pp. 721–7. doi: 10.1083/jcb.200605125.

- Waschke, J. and Spindler, V. (2014) 'Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus', *Medicinal Research Reviews*, 34(6), pp. 1127–1145. doi: 10.1002/med.21310.
- Wee, P. *et al.* (2015) 'EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis', *Cellular Signalling*, 27(3), pp. 638–651. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.11.030.
- Weiss, D. *et al.* (2015) 'Autoantibody levels and clinical disease severity in patients with pemphigus: comparison of aggregated anti-desmoglein ELISA values and indirect immunofluorescence titres.', *Acta Dermato-Venereologica*, 95(5), pp. 559–64. doi: 10.2340/00015555-2023.
- Wetzelsch, S., Seipold, L. and Saftig, P. (2017) 'The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target?', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(11), pp. 2071–2081. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.005.
- Wild-Bode, C. *et al.* (2006) 'A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M601542200.
- Wilgram, G.F., Caulfield, J.B. and Lever, W.F. (1961) 'An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris.', *The Journal of Investigative Dermatology*, 36, pp. 373–82. doi: 10.1038/jid.1961.58.
- Williamson, L. *et al.* (2006) 'Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin.', *The EMBO journal*, 25(14), pp. 3298–309. doi: 10.1038/sj.emboj.7601224.
- Williamson, L. *et al.* (2007) 'Nuclear c-Myc: A molecular marker for early stage pemphigus vulgaris', *Journal of Investigative Dermatology*, 127(6), pp. 1549–1555. doi: 10.1038/sj.jid.5700735.
- Yamamoto, T. *et al.* (2011) 'Human leukocyte antigen genotypes and antibody profiles associated with familial pemphigus in Japanese', *The Journal of Dermatology*, 38(7), pp. 711–716. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.01057.x.
- Yamashita, Y. *et al.* (2014) 'Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa

- cell luteinization and oocyte maturation', *Endocrinology*. doi: 10.1210/en.2013-1655.
- Yan, L., Wang, J.-M. and Zeng, K. (2012) 'Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis', *British Journal of Dermatology*, 167(4), pp. 768–777. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11040.x.
 - Yan, Y., Shirakabe, K. and Werb, Z. (2002) 'The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200112026.
 - Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) 'Untangling the ErbB signalling network.', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(2), pp. 127–37. doi: 10.1038/35052073.
 - Yin, T. *et al.* (2005) 'Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor.', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp. 40355–63. doi: 10.1074/jbc.M506692200.
 - Yoon, S., Choi, C. M. and Lee, J. C. (2018) 'The different path of T790M-positive EGFR-mutant lung cancer.', *Annals of Translational Medicine*, 6(Suppl 1), p. S47. doi: 10.21037/atm.2018.10.01.
 - Yousef, H., Alhajj, M. and Sharma, S. (2019) *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*, StatPearls. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262154>.
 - Yu, H. and Jove, R. (2004) 'The STATs of cancer--new molecular targets come of age.', *Nature Reviews. Cancer*, 4(2), pp. 97–105. doi: 10.1038/nrc1275.
 - Zhao, C. Y. and Murrell, D. F. (2015) 'Pemphigus vulgaris: an evidence-based treatment update', *Drugs*, 75(3), pp. 271–284. doi: 10.1007/s40265-015-0353-6.
 - Zhou, B.-B. S. *et al.* (2006) 'Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer', *Cancer Cell*, 10(1), pp. 39–50. doi: 10.1016/j.ccr.2006.05.024.
 - Zhu, X. *et al.* (2014) 'Epidemiology of pemphigus vulgaris in the northeast china:

a 10-year retrospective study', *The Journal of Dermatology*, 41(1), pp. 70–75. doi: 10.1111/1346-8138.12286.

- Zillikens, D. *et al.* (1993) 'Evidence for cell-mediated immune mechanisms in the pathology of pemphigus.', *The British Journal of Dermatology*, 128(6), pp. 636–43. doi: 10.1111/j.1365-2133.1993.tb00259.x.
- Živanović, D. *et al.* (2017) 'Correlation of antibodies against desmogleins 1 and 3 with indirect immunofluorescence and disease activity in 72 patients with pemphigus vulgaris.', *Acta Dermatovenerologica Croatica*, 25(1), pp. 8–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28511744>.

ANEXO

Ivars M, España A, Alzuguren P, Pelacho B, Lasarte JJ, López-Zabalza MJ. The involvement of ADAM10 in acantholysis in mucocutaneous pemphigus vulgaris depends on the autoantibody profile of each patient. *British Journal of Dermatology*, 2019. <http://doi.org/10.1111/bjd.18382>