

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

**ESTUDIO *IN VIVO* DEL PAPEL DE LA
VALENCIA DE LOS AUTOANTICUERPOS DEL
PÉNFIGO VULGAR EN LA PATOGENIA DE LA
ENFERMEDAD**

Tesis presentada por José-Manuel Mascaró Galy para optar al
grado de Doctor en Medicina.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700679832



ÍNDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. ESTRUCTURAS CELULARES DE ADHESIÓN	2
1.1. <i>Zonulae ocludens</i>	3
1.2. <i>Zonula adherens</i>	4
1.3. Uniones <i>gap</i>	6
1.4. Desmosomas	6
1.5. Hemidesmosomas	14
2. ENFERMEDADES AMPOLLOSAS AUTOINMUNES	19
2.1. Enfermedades Ampollosas Autoinmunes Subepidérmicas	21
2.1.1. Penfigoide Ampolloso	21
Autoanticuerpos	22
Autoantígenos	23
Patogenia	24
2.1.2. Herpes Gestationis	26
Autoanticuerpos	27
Autoantígeno	27
Patogenia	28
2.1.3. Penfigoide Cicatricial	28
Autoanticuerpos	29
Autoantígenos	30
Patogenia	31
2.1.4. Epidermolisis Ampollosa Adquirida	32
Autoanticuerpos	33
Autoantígeno	34

Patogenia	34
2.1.5. Enfermedad Ampollosa IgA Linear	35
Autoanticuerpos	36
Autoantígenos	36
Patogenia	37
2.2. Enfermedades Ampollosas Autoinmunes	
Intraepidérmicas (Pénfigos)	38
2.2.1. Pénfigo Vulgar	38
Autoanticuerpos	39
Patogenia	39
Autoantígeno	40
2.2.2. Pénfigo Foliáceo	45
Autoanticuerpos	45
Patogenia	46
Autoantígeno	46
2.2.3. Pénfigo Paraneoplásico	49
Autoanticuerpos	49
Autoantígenos	51
Patogenia	52
3. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS	
EN LA ACANTOLISIS	54
3.1. Papel del Complemento	55
3.2. Valencia de los Anticuerpos	56
3.3. Pérdida de Función de la Desmogleína 3	58
3.4. Proteasas	59
3.5. Activación de Señales de Transducción Intracelular	61

II. <u>OBJETIVOS</u>	65
III. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	67
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	67
2. SUEROS HUMANOS EMPLEADOS	67
3. PRODUCCIÓN DE DESMOGLEÍNA 3 RECOMBINANTE UTILIZANDO EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL BACULOVIRUS	68
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS	69
4.1. Inmunofluorescencia	69
4.2. Inmunoblot	69
4.3. Inmunoprecipitación	71
5. PREPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES INYECTADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA	73
5.1. Purificación de la IgG a partir del suero	73
5.2. Preparación de los fragmentos F(ab') ₂	74
5.3. Preparación de los fragmentos Fab	75
6. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA A ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	76
6.1. Evaluación de la patogenicidad de las fracciones IgG, F(ab') ₂ y Fab de los sueros de pacientes con pénfigo vulgar	76
6.2. Curso evolutivo de la enfermedad inducida por las fracción Fab del pénfigo vulgar. Comparación con el curso evolutivo de la fracción IgG	76

6.3. Comparación del poder patógeno de distintas dosis de IgG y Fab de pénfigo vulgar	77
6.4. Comparación de la patogenicidad de la Fab de pénfigo vulgar utilizando dos vías diferentes de inyección	77
6.5. Examen de los animales	78
6.6. Técnicas de inmunofluorescencia	78
IV. <u>RESULTADOS</u>	80
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS	80
1.1. Inmunofluorescencia	80
1.2. Inmunoblot	80
1.3. Inmunoprecipitación	81
2. FRACCIONES UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA	83
3. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA A ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	85
3.1. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c	85
3.1.1. La IgG de pacientes con pénfigo vulgar es patógena en ratones recién nacidos de tipo BALB/c	85
3.1.2. Los fragmentos F(ab')₂ de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c	89
3.1.3. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c	93

3.1.4. Los ratones inyectados con las distintas fracciones de sueros de pacientes con pénfigo vulgar con anticuerpos contra la desmogleína 1 no difieren respecto a los que han sido inyectados con sueros que no presentan dichos anticuerpos	97
3.2. Estudio del curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar	98
3.2.1. Al cabo de tan sólo dos horas de inyectarse los anticuerpos los ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar ya presentan lesiones microscópicas	98
3.2.2. El curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar es similar al de los ratones inyectados con la fracción IgG del mismo suero	99
3.3. Diferentes dosis equimolares de las fracciones IgG y Fab de pénfigo vulgar no difieren en cuanto a su patogenicidad en el ratón	104
3.4. Las inyecciones subcutáneas de Fab de pénfigo vulgar son más eficaces que las intraperitoneales a la hora de causar enfermedad en los animales de experimentación	106
V. <u>DISCUSIÓN</u>	107
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	115
VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	118

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ampollas autoinmunes constituyen un grupo de enfermedades cutáneas caracterizadas por la presencia de anticuerpos en el suero de los pacientes dirigidos contra antígenos propios de la piel. Estos anticuerpos se denominan por dicho motivo autoanticuerpos y pueden detectarse utilizando técnicas de inmunofluorescencia bien sea circulando en el suero o bien unidos *in vivo* a la piel de los pacientes. Los antígenos contra los cuales van dirigidos los anticuerpos se hallan localizados a nivel de la superficie celular de los queratinocitos o a nivel de la unión dermoepidérmica. Cada enfermedad suele presentar una clínica, histopatología y patrones de inmunofluorescencia producidos por los autoanticuerpos que le son propios y permiten realizar el diagnóstico. Existen además técnicas bioquímicas y de biología molecular que han permitido que en los últimos años se hayan podido identificar y caracterizar los antígenos cutáneos reconocidos por estos autoanticuerpos.

Las ampollas están ocasionadas por la separación de los queratinocitos entre sí o de epidermis de la dermis. La comprensión de los mecanismos que dan lugar a la separación ha permitido entender mejor los mecanismos que median la adhesión celular con otras células y con la matriz extracelular.

Los conocimientos adquiridos en los últimos años han permitido demostrar que los antígenos contra los cuales van dirigidos los autoanticuerpos en las enfermedades ampollas autoinmunes son al mismo tiempo las moléculas responsables de mantener el contacto entre los queratinocitos o entre los queratinocitos basales y la matriz extracelular en condiciones fisiológicas. Así, por ejemplo, se ha podido ver que los autoanticuerpos en el pénfigo vulgar (Amagai y cols., 1991), pénfigo foliáceo (Stanley y cols., 1986), y pénfigoide ampolloso (Mutasim y cols., 1986 ;

Stanley y cols., 1988; Díaz y cols., 1990) reconocen glicoproteínas desmosómicas y hemidesmosómicas. Además se ha demostrado que los autoanticuerpos dirigidos contra estos antígenos epidérmicos son capaces de inducir enfermedad en ratones recién nacidos cuando se transfieren de forma pasiva (Anhalt y cols., 1982; Roscoe y cols., 1985; Liu y cols., 1993b). Estos animales de experimentación reproducen las pérdidas de cohesión epidérmicas típicas de las enfermedades humanas cuando son inyectados con los autoanticuerpos. Por lo tanto, el estudio de estas enfermedades no sólo ha permitido avanzar en el conocimiento de estas patologías concretas, sino que también ha ampliado nuestros conocimientos en el campo de la biología cutánea. Es interesante notar que se ha observado que la molécula diana de los anticuerpos en enfermedades ampollas autoinmunes es la misma que está alterada por mutaciones genéticas en algunas epidermolisis ampollas hereditarias. Revisaremos en primer lugar la estructura y composición molecular de las organelas especializadas en la adhesión celular, uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas, para comentar posteriormente las principales enfermedades ampollas autoinmunes.

1. ESTRUCTURAS CELULARES DE ADHESIÓN

Las estructuras adhesivas más importantes de la epidermis son los desmosomas, hemidesmosomas y las uniones adherentes (Gumbiner, 1996). Las dos primeras unen los filamentos intermedios de queratina a la membrana celular, mientras que las uniones adherentes median la unión de la membrana con los filamentos de actina. Todas estas estructuras están constituidas por distintas proteínas que armonizan una estructura compleja pero a su vez dinámica, que permite por una parte crear una estructura lo

suficientemente estable para mantener las células unidas entre sí y a la matriz extracelular, pero también lo suficientemente flexible como para facilitar su desensamblaje cuando deben migrar dentro de la epidermis.

Los diferentes epitelios del organismo, al igual que el resto de tejidos, presentan estructuras especializadas que permiten la unión intercelular. Además de facilitar la adhesividad, estas uniones favorecen la comunicación entre las células y facilitan pequeños compartimentos para producir un intercambio entre las mismas. Estas uniones son principalmente de cuatro tipos: *zonulae ocludens*, *zonulae adherens*, desmosomas (*maculae adherens*), y las uniones *gap* o uniones de contacto. Además, existen otras uniones especializadas que permiten la adherencia de la célula epitelial a la membrana basal, destacando principalmente los hemidesmosomas y las uniones focales (Morley y Lane, 1994). Estas estructuras han sido estudiadas básicamente en el epitelio columnar del tubo digestivo debido a la abundancia de uniones intercelulares a este nivel. En la epidermis se han descrito solamente algunas de estas uniones, siendo la densidad de cada una distinta dependiendo del estrato o nivel en el que asientan.

1.1. *Zonulae ocludens*

Las *zonulae ocludens*, también denominadas *tight junctions*, se hallan localizadas a nivel del borde láteroapical de las células epiteliales y junto con las *zonula adherens* y los desmosomas constituyen el denominado complejo de unión. Están poco desarrolladas en los tejidos epiteliales que carecen de luz, como es el caso de la epidermis. En estos casos, el complejo de unión está únicamente formado por las *zonulas adherens* y los desmosomas. La *zonulae ocludens* está constituida básicamente por adherencias puntiformes de las dos membranas alrededor de toda la célula

a modo de cinturón, creando una estructura semejante a una malla que permite la formación de un espacio cerrado para el intercambio de macromoléculas, pequeños solutos o iones entre dos células contiguas (Kachar y Reese, 1982). Se piensa que la ocludina, una proteína que forma parte integral de la membrana contribuye a la formación de este tipo de uniones (Furuse y cols., 1994). La ocludina interaccionaría con dos proteínas de las placas citoplasmáticas denominadas ZO-1 y ZO-2. Se piensa que estas últimas juegan un papel a la hora del acoplamiento de la ocludina o de cara a su localización específica a nivel del borde láteroapical de la célula. Otras proteínas del citoesqueleto como la cingulina, el antígeno 7H6, y la actina también se localizan a nivel de este tipo de uniones.

1.2. Zonula adherens

Las *zonulas adherens* presentan una gran semejanza con los desmosomas y se distribuyen en todas las capas de la epidermis (Kaiser y cols., 1993). Pueden observarse en íntima asociación con los desmosomas en todos los epitelios, incluida la epidermis (Kaiser y cols., 1993). En este tipo de unión intercelular las dos membranas celulares se aproximan a nivel de un área puntiforme en la cual la distancia entre las dos células es de unos 22-35 nm. Mediante microscopía electrónica se aprecia una placa citoplasmática densa a la que se unen filamentos citoplasmáticos desde el interior de la célula abocando hacia la membrana y conectando con ésta a través de dicha placa densa (Farquhar y Palade, 1963). A diferencia de los desmosomas no se observa una línea densa intermedia.

La porción extracelular de las *zonula adherens* está constituida básicamente por cadherinas clásicas como la cadherina E. Estas moléculas atraviesan la membrana plasmática y presentan una porción extracelular y

otra intracelular. El dominio extracelular de una de estas moléculas conecta de forma homofílica con el dominio extracelular de otra molécula de cadherina E en la célula vecina (Amagai, 1996). La porción intracelular de estas uniones está formada por la región intracelular de las moléculas de cadherina E y por otras proteínas intracitoplasmáticas características. Entre ellas está la placoglobina, la única proteína común entre las uniones adherentes y los desmosomas, en íntima conexión con la cadherina E, aunque a diferencia de lo observado en los desmosomas, la relación estequiométrica entre cadherina E/placoglobina es 1:1 (Kowalczyk y cols., 1996). Existen además otras moléculas denominadas α y β cateninas que sirven de unión con los filamentos de actina. La β -catenina, al igual que la placoglobina, también se une a la región intracelular de la cadherina E, aunque de forma más efectiva que esta (Aberle y cols., 1996). La α -catenina o vinculina se une al complejo formado por la placoglobina/ β -catenina (Aberle y cols., 1996), y sirve de anclaje de las fibras de α -actina con las uniones adherentes. Se han descrito otras proteínas estructurales citoplásmicas aunque su función todavía no es bien conocida (Shibamoto y cols., 1995).

Se ha observado que la formación de las *zonula adherens* precede la aparición de los desmosomas en los cultivos de queratinocitos (O'Keefe y cols., 1987). Este hecho ha llevado a algunos autores a afirmar que las *zonula adherens* tendrían un papel primordial en el control de la estratificación de la epidermis, facilitando la formación de los desmosomas como estructuras mecánicamente más fuertes (Amagai y cols., 1995; Lewis y cols., 1994; Wheelock y Jensen, 1992). Así, se ha confirmado que la cadherina E tiene un papel inductor en la formación de los desmosomas. De este modo, la presencia de mutaciones en la cadherina E da lugar a un retraso en la formación de los desmosomas, y estos reaparecen cuando se transfecta las células con dichas cadherinas normales, confirmándose el

papel de las *zonula adherens* en la formación de los desmosomas (Shimoyama y cols., 1992 ; Watanabe y cols., 1994 ; Haftek y cols., 1996).

1.3. Uniones *gap*

Aunque se hallan presentes en todos los epitelios, no se sabe realmente cual es su función en la epidermis. Se pueden apreciar zonas de la membrana plasmática en íntima conexión, en las cuales el espacio intercelular es de sólo 2 nm. Esas uniones están constituidas por un conglomerado de pequeñas subunidades proteicas con forma hexagonal, que a modo de cilindros o canales atraviesan la membrana plasmática, con una distancia entre ellas de unos 9 nm. Se piensa que estos canales permitirían el intercambio de iones entre las células, favoreciendo el acoplamiento eléctrico celular (Steinberg, y cols., 1987). Estas uniones no presentan ninguna conexión con filamentos citoplasmáticos.

1.4. Desmosomas

Los desmosomas son unas estructuras de adhesión celular que se localizan entre las células dando soporte a todo el epitelio (**FIGURA 1**) (Kelly, 1966). Utilizando microscopía electrónica se observa que presentan una estructura central de unos 20- 30 nm denominada *core* o núcleo del desmosoma que separa la membrana plasmática de las dos células que forman el desmosoma. En cortes transversales se observa una estructura media a partir de la cual se extienden lateralmente unas formaciones electrodensas que alcanzan la membrana celular. Justo por debajo de la membrana plasmática de cada uno de los queratinocitos existe una placa densa donde se insertan los filamentos intermedios de queratina del citoplasma celular.

Los desmosomas son unas uniones dependientes del calcio. Así, se ha observado que en cultivos de queratinocitos aparece una disrupción de estas uniones cuando la concentración de calcio es baja (Hennings y Holbrook, 1983).

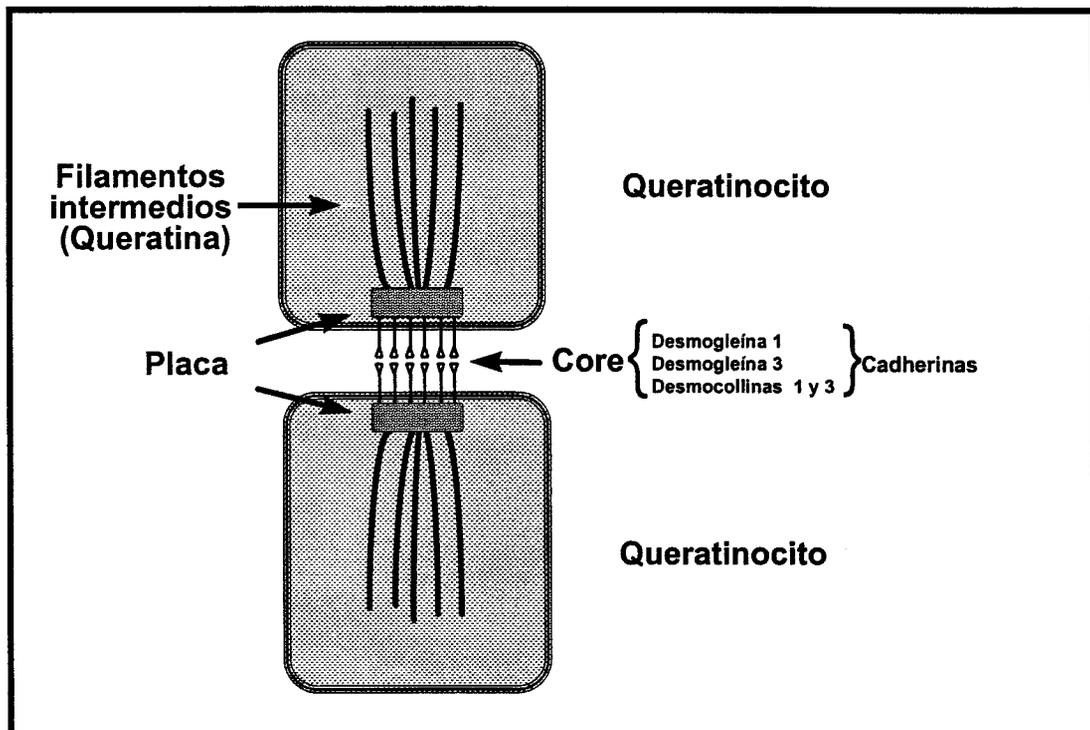


FIGURA 1. Estructura de un desmosoma.

Los componentes moleculares de los desmosomas han sido estudiados y caracterizados en los últimos años (Green y Jones, 1996). Se pueden dividir en dos grandes grupos (TABLA 1) (Schwartz y cols., 1990).

TABLA 1. Componentes Moleculares del Desmosoma	
Localización	Proteínas
Placa Desmosómica(Citoplasma)	Queratocalmina (250-kDa) Desmoplaquina I (245-kDa) Desmoplaquina II (215-kDa) Placoglobina (85-kDa) Placofilina o proteína de la banda 6 (75-kDa) Desmomioquina (680-kDa)
Core (Espacio Intercelular)	<u>Cadherinas:</u> Desmogleína 1 (165-kDa) Desmogleína 2 (epitelio del colon) Desmogleína 3 (130-kDa) Desmocollinas 1a,b ; 2a,b ; 3a,b

El primer grupo está formado por una serie de polipéptidos de alto peso molecular que forman la placa desmosómica, e incluye a las desmoplaquinas I y II, placoglobina, placofilina (proteína de la banda 6), desmomioquina, y queratocalmina (también llamada desmoccalmina) (Fairley y cols., 1991). El segundo grupo de componentes desmosómicos está formado por glicoproteínas que atraviesan la membrana celular (proteínas *transmembrana*) de manera que su región extracelular forma el *core* desmosómico, y la intracelular se inserta en la placa desmosómica. La relación entre los principales componentes moleculares de los desmosomas y hemidesmosomas se hallan esquematizada en la **FIGURA 2**.

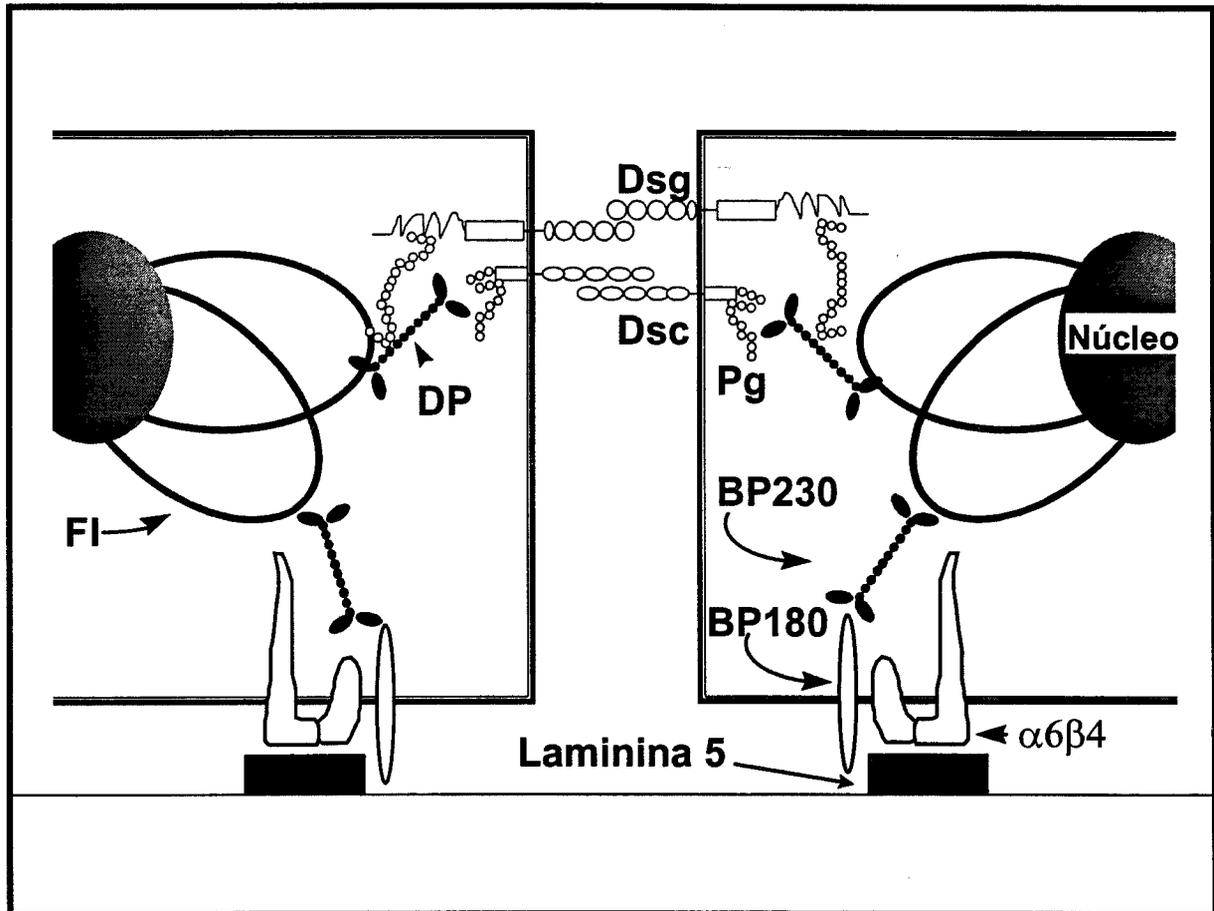


FIGURA 2. Esquema general en el que se muestran los principales componentes de los desmosomas y hemidesmosomas en dos células epidérmicas. Ambas estructuras se hallan conectadas al citoesqueleto a través de los filamentos intermedios (FI). Dsg y Dsc corresponden a las desmogleínas y desmocollinas. Pg, Placoglobina. DP, desmoplaquina.

La porción extracelular de los desmosomas está constituida por las denominadas cadherinas desmosómicas, las cuales pueden ser de dos tipos: desmogleínas y desmocollinas. Estas glicoproteínas incluyen entre otras a la desmogleínas 1, 2 y 3 (Amagai y cols.,1991; Koch y cols., 1990 y 1991; Wheeler y cols., 1991), y a las desmocollinas 1, 2 y 3 (Collins y cols., 1991; Mechanic y cols., 1991; Koch y cols., 1992). Todas estas proteínas,

de la misma forma que todas las cadherinas, son proteínas de transmembrana tipo I, es decir la región aminoterminal es extracelular, y la región carboxiterminal intracelular, y se caracterizan por presentar cuatro regiones en su porción extracelular. Se diferencian de las cadherinas clásicas por la presencia de una porción adicional en su región carboxiterminal, siendo las otras porciones intracelulares comunes a todas las cadherinas (Amagai, 1996).

Tal como se ha indicado existen tres isoformas de desmogleínas. La desmogleína 1 y desmogleína 3 se encuentran casi exclusivamente a nivel de los epitelios estratificados. En la epidermis la desmogleína 1 se expresa de forma creciente según va madurando el queratinocito desde la capa basal, siendo su expresión mayor a nivel de la capa granulosa. La desmogleína 3 se expresa casi exclusivamente a nivel de los estratos más basales de la epidermis (Arneman y cols., 1993). La desmogleína 2, por el contrario, tiene una expresión más difusa, apareciendo en todos los tejidos que presentan desmosomas, incluido el miocardio (Schafer y cols., 1994). La estructura general de estas moléculas se halla resumida en la **FIGURA 3**.

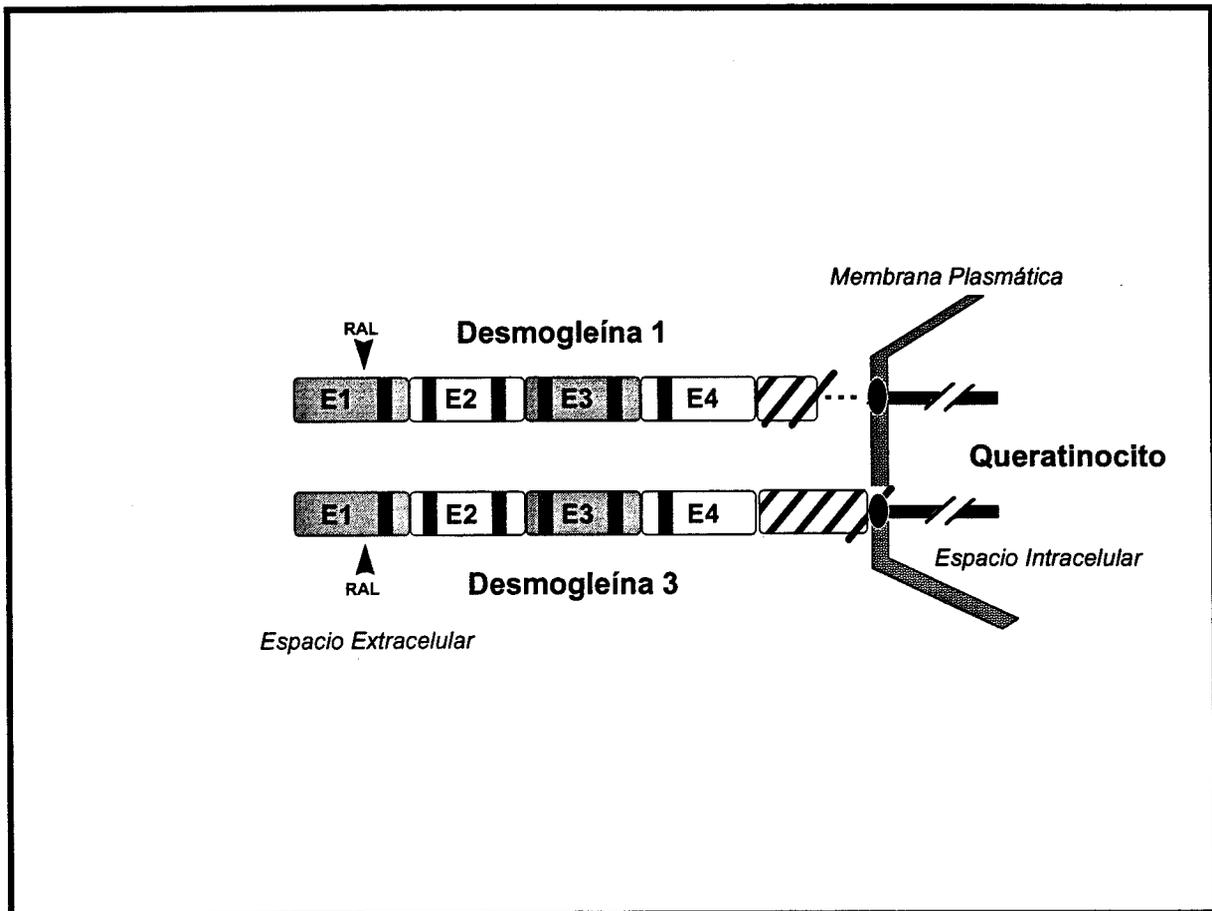


FIGURA 3. Representación esquemática de la estructura molecular de las desmogleínas 1 y 3.

Otro grupo de cadherinas desmosómicas es el de las desmocollinas, que tienen una gran semejanza con las desmogleínas. Existen también tres isoformas, cada una con una forma *a*, más larga, y otra *b* más corta. La desmocolina 1 suele asentar en los estratos superficiales, y más maduros de la epidermis; la desmocolina 2 en los estratos intermedios; y la desmocolina 3 sólo se detecta de forma relevante a nivel de la capa basal (Legan y cols., 1994). Se ha demostrado la presencia de desmocolina 1 y desmocolina 3 en desmosomas que asientan en estratos intermedios de la epidermis, en

zonas donde existe un solapamiento en la expresión de ambas cadherinas (North y cols., 1996).

Ambos grupos de cadherinas presentan una íntima relación con diferentes proteínas a nivel intracelular a través de su porción intracitoplásmica. Tanto la desmogleína como la desmocolina se asocian con la placoglobina por medio de la región intracelular (Mathur y cols., 1994; Troyanovsky y cols., 1994; Roh y Stanley, 1995). La placoglobina se expresa en toda la epidermis, aumentando de forma progresiva desde los estratos basales hacia las capas más superficiales, de forma paralela a la densidad de los desmosomas (Arneman y cols., 1993). Cada cadherina se une a epítomos diferentes de la placoglobina (Witcher y cols., 1996; Chitaey y cols., 1996), marcando de esta forma la selectividad para que esta proteína se una a la desmogleína o a la desmocolina en un mismo desmosoma, o a las cadherinas clásicas (cadherina E) a nivel de las *zonula adherens*. Las desmogleínas y las desmocolinas no se unen a la placoglobina en la misma proporción. Es decir, la relación estequiométrica es distinta para cada una de las cadherinas. Así, mientras que una molécula de desmogleína se une a seis de placoglobina, la desmocolina se une únicamente a una de placoglobina (Kowalczyk y cols., 1996). Estos hallazgos demuestran que las propiedades adherentes y la funciones de cada cadherina son distintas a nivel de los desmosomas.

Las proteínas constitutivas de la placa desmosómica favorecen la unión de los filamentos intermedios de queratina al desmosoma. Dentro de este grupo de proteínas las mejor caracterizadas son las desmoplaquinas. Al igual que la placoglobina, estas proteínas se encuentra en toda la epidermis, aunque se expresan de forma progresiva desde la capa basal hasta los estratos más superficiales de la epidermis (Arneman y cols., 1993). Se conocen dos isoformas. La desmoplaquina I (265-kDa), y la desmoplaquina II (250-kDa) resultado esta última de una fragmentación de

la desmoplaquina I. A diferencia de otras proteínas desmosómicas, las desmoplaquinas no son exclusivas de los epitelios sino que existen en otros tejidos, como por ejemplo el miocardio. Se ha demostrado que estas proteínas son capaces de unirse a los filamentos intermedios. Esta interacción se produce entre la porción carboxiterminal de la desmoplaquina y la región aminoterminal de los filamentos intermedios (Stappenbeck y Green KJ, 1992 ; Stappenbeck y cols., 1993). La porción amino-terminal de las desmoplaquinas, por el contrario, interacciona directamente con la placa desmosómica, aunque no se conoce con exactitud si es a través de su unión a la placoglobina o a otra proteína intermedia (Green y cols., 1988 ; Kouklis y cols., 1994). La desmoplaquina I interacciona sólo con los filamentos intermedios (queratinas) tipo II (Kouklis y cols., 1994). En cambio, otras formas de desmoplaquina conectan con otros tipos de filamentos (Stappenbeck y cols., 1993). Ninguna de las dos formas de desmoplaquina se encuentran en las *zonula adherens* (Green y cols., 1988). Se ha demostrado, no obstante, que una mutación estructural de la desmoplaquina que impida la unión de ésta con los filamentos intermedios no produce una desestructuración de los desmosomas, manteniéndose su integridad. Se piensa por ello que aunque esta proteína de la placa desmosómica sea importante para mantener la adhesividad, deben existir otras proteínas dentro de la placa que permitan el anclaje a la membrana de los filamentos intermedios (Stappenbeck y cols., 1994).

Dentro del grupo de proteínas de la placa desmosómica, con función de conexión entre el desmosoma y los filamentos intermedios, destacan también la plectina (Foisner y Wiche, 1991), la desmocalmína (250-kDa) (Tsukita y Tsukita, 1985 ; Fairley y cols., 1991), una proteína relacionada con la lámina B (Cartaud y cols., 1990) y la placofilina o proteína de banda 6 (75-kDa) (Krapprell y cols., 1988). La plectina se ha demostrado tanto a nivel de desmosomas como a nivel nuclear, conectando ambos extremos de los

filamentos intermedios (Foisner y Wiche, 1991). La desmocalmina se ha relacionado únicamente con filamentos de queratina (filamentos intermedios I y II), y se asocia al desmosoma mediante una forma calcio-calmodulina dependiente (Tsukita y Tsukita, 1985). La proteína relacionada con la lámina B tiene un peso molecular de 140-kDa y está incluida en la placa desmosómica (Cartaud y cols., 1990). Por último, la proteína de banda 6 asienta únicamente en los desmosomas de algunos tejidos, entre los que se encuentra la epidermis, y presenta una afinidad importante para interaccionar con los filamentos intermedios tipo I (Krapprell y cols., 1988).

Existen otras proteínas detectadas en los desmosomas cuyo significado es todavía incierto. Entre otras destacan la desmomioquina (680-kDa) que aparece en la porción lateral de la placa desmosómica (Hieda y cols., 1989), el antígeno D1 (Franke y cols., 1981), y el antígeno E48 (22-kDa), detectado únicamente en los desmosomas de los epitelios estratificados.

1.5. Hemidesmosomas

Los hemidesmosomas son unas estructuras localizadas a nivel del polo dérmico de los queratinocitos basales, es decir, aquella región de las células basales de la epidermis que contacta con la dermis (**FIGURA 4**).

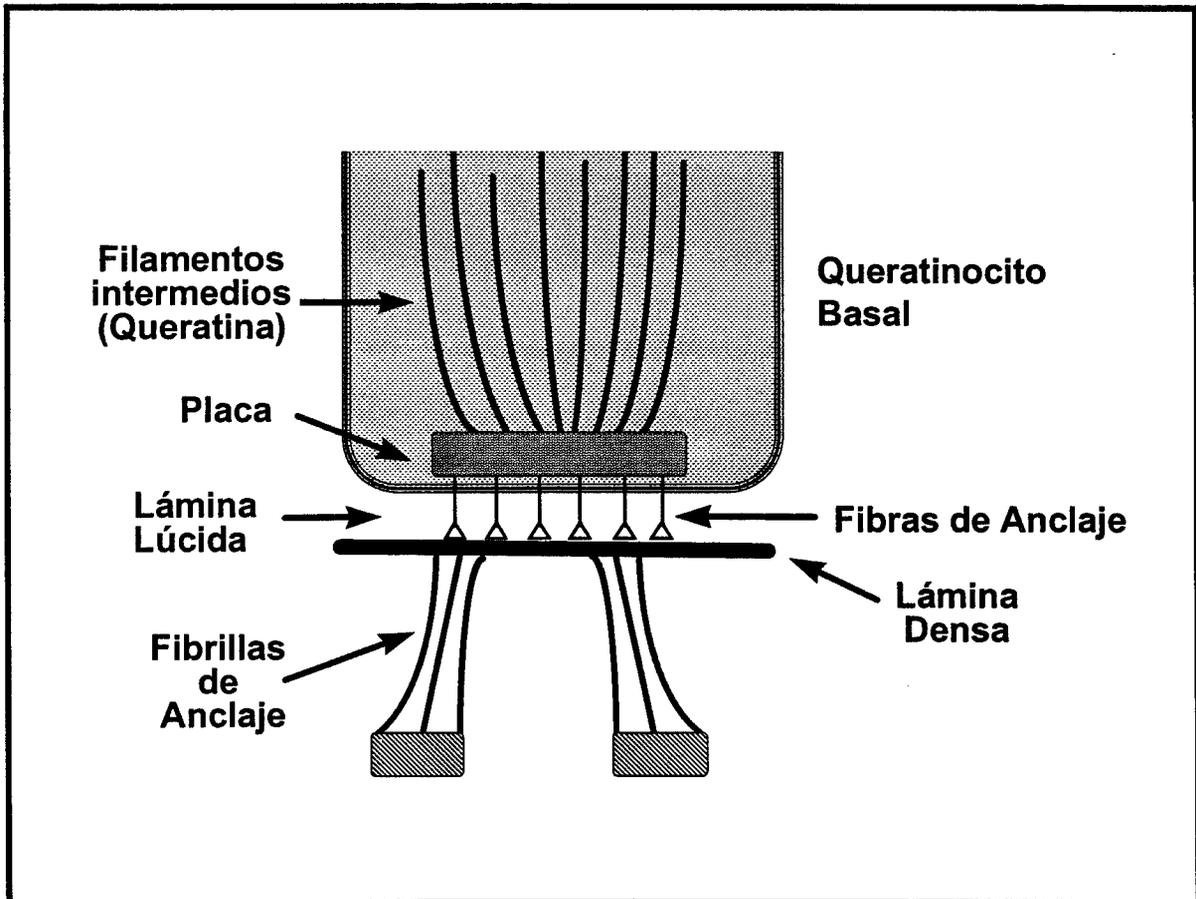


FIGURA 4. Estructura de un hemidesmosoma.

La estructura de los hemidesmosomas es similar a la que tendría medio desmosoma. Así, existe una placa intracelular a la que se insertan los filamentos intermedios de queratina y una región extracelular que forma parte y continúa la lámina lúcida. La lámina lúcida es un espacio estrecho que separa los queratinocitos basales de la lámina densa y de otros componentes de la membrana basal. Los distintos componentes

moleculares de los hemidesmosomas y otras moléculas de la matriz extracelular dan lugar a una fuerza adhesiva que permite la unión física entre la epidermis y la dermis. Algunos de los componentes moleculares de los hemidesmosomas han sido caracterizados (Green y Jones, 1996) y se hallan resumidos en la **TABLA 2**.

TABLA 2. Componentes Moleculares del Hemidesmosoma		
Proteína	Peso Molecular	Localización
Antígeno BP230	230-kDa	Placa
Antígeno BP180	180-kDa	Transmembrana
Hemidesmosoma 1	500-kDa	Placa
Componente 200-kDa	200-kDa	Placa
Componente 125-kDa	125-kDa	¿Transmembrana?
Integrina $\alpha 6\beta 4$	135 y 205-kDa	Ambas

Dos de estas proteínas han sido identificadas como antígenos diana de los anticuerpos de pacientes con penfigoide ampuloso. Uno es un polipéptido de 230-kDa (BP230, del inglés *Bullous Pemphigoid*, y luego el peso molecular correspondiente) que es reconocido por la mayoría de los sueros de pacientes con penfigoide ampuloso y que se ha visto que se localiza a nivel de la placa hemidesmosómica (Stanley y cols., 1981; Klatte y cols., 1989). Esta proteína presenta una homología significativa en su secuencia con la desmoplaquina I, y junto con la plectina formarían parte de una familia de polipéptidos con funciones de organización de los filamentos intermedios (Tanaka y cols., 1991a; Green y cols., 1992).

Otro antígeno identificado gracias a los sueros de pacientes con penfigoide ampuloso es BP180. Se trata de una glicoproteína de

transmembrana de tipo II de 180-kDa. Posee una serie de características que la hace única: el extremo aminoterminal de esta proteína es intracelular (a diferencia de la mayoría de proteínas de transmembrana que son de tipo I) y el extremo carboxiterminal constituye la región extracelular. Dicha región extracelular está formada por 15 dominios de estructura colágena y se proyecta hacia la matriz extracelular en la lámina lucida (**FIGURA 5**) (Giudice y cols., 1991 y 1992 ; Hopkinson y cols., 1992 ; Nishikawa y cols., 1993). Se piensa que la región extracelular de BP180 juega un papel importante en la adhesión de los queratinocitos basales a la dermis. Otra proteína bien caracterizada de los hemidesmosomas es la integrina $\alpha 6\beta 4$. Sin embargo, se desconoce hasta el momento su papel en la inmunopatología cutánea de las enfermedades ampollosas autoinmunes. El resto de las proteínas hemidesmosómicas que se indican en la **TABLA 2** no han sido todavía bien caracterizadas.

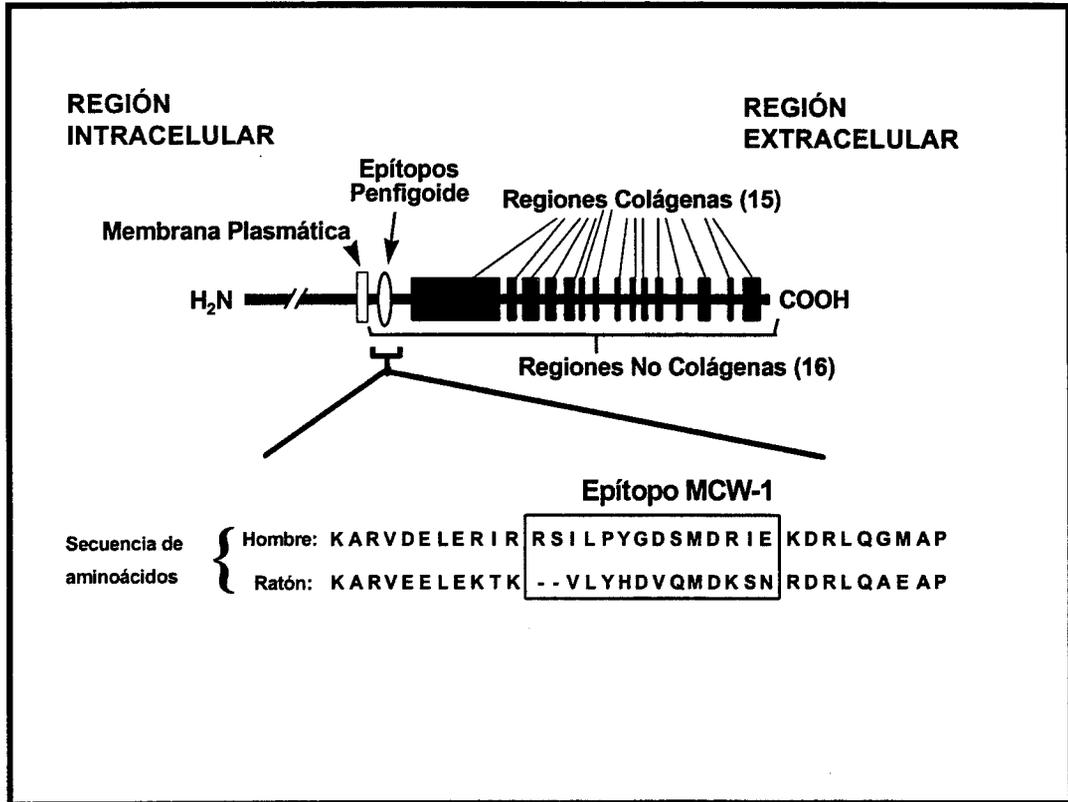


FIGURA 5. Estructura de BP180

2. ENFERMEDADES AMPOLLOSAS AUTOINMUNES

Las enfermedades ampollas autoinmunes suelen clasificarse en dos grandes grupos: el de las enfermedades ampollas subepidérmicas y el de las intraepidérmicas. El primer grupo está formado por aquellas enfermedades en que las ampollas se forman justo por debajo de la epidermis; mientras que en el segundo, la formación de las ampollas se produce en el interior de la epidermis (FIGURA 6). Este grupo de enfermedades se halla resumido en la TABLA 3.

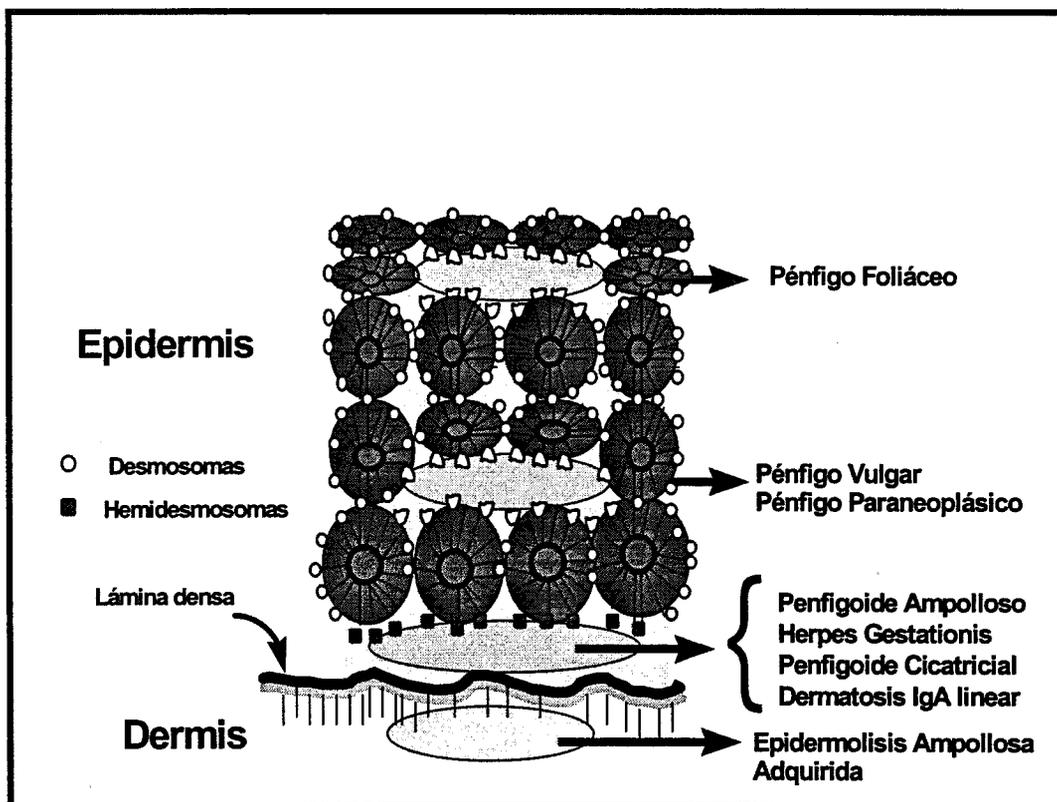


FIGURA 6. Localización de las ampollas en las enfermedades ampollas autoinmunes.

TABLA 3. Enfermedades ampollosas autoinmunes de la piel

Enfermedad	Inmunofluorescencia Directa	Inmunofluorescencia Indirecta	Autoantígenos
Enfermedades Ampollosas Subepidérmicas			
<i>Penfigoide Ampolloso</i>	Depósitos Lineares de IgG y/o C3 en la membrana basal	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal (80%)	BP230 (230-kDa) y BP180 (180-kDa)
<i>Herpes Gestationis</i>	Depósitos Lineares de C3 en la membrana basal	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal (20%)	BP180 (180-kDa)
<i>Penfigoide Cicatricial</i>	Depósitos Lineares de IgG y/o C3 en la membrana basal	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal (30%)	BP180 (180-kDa), subunidad α de la laminina 5 (165-kDa)
<i>Epidermolisis Ampolloso Adquirida</i>	Depósitos Lineares de IgG y/o C3 en la membrana basal	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal (50%)	Colágeno VII (290-kDa)
<i>Enfermedad Ampolloso IgA Linear</i>	Depósitos Lineares de IgA y C3 en la membrana basal	Anticuerpos de tipo IgA dirigidos contra la membrana basal	Antígenos de 97-kDa y 45-kDa
Enfermedades Ampollosas Intraepidérmicas			
<i>Pénfigo Vulgar</i>	IgG intercelular y/o C3	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra los espacios intercelulares de los epitelios planos estratificados	Desmogleína 3 (130-kDa)
<i>Pénfigo Folíaceo</i>	IgG intercelular y/o C3	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra los espacios intercelulares de los epitelios planos estratificados	Desmogleína 1 (160-kDa) Desmogleína 1 (160-kDa)
<i>Pénfigo Paraneoplásico</i>	IgG intercelular y/o C3. Depósitos lineares o granulares a nivel de la membrana basal	Anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra los espacios intercelulares de los epitelios planos estratificados, de transición (vejiga de rata), simples, y columnares, así como algunos tejidos no epiteliales.	Desmoplaquina 1 (250-kDa), Desmoplaquina 2 (210-kDa), BP230 (230-kDa), antígenos de 190 y 170-kDa.

2.1. Enfermedades Ampollosas Autoinmunes Subepidérmicas

Las enfermedades ampollosas autoinmunes subepidérmicas tienen en común la formación de ampollas entre la epidermis y la dermis y el depósito de autoanticuerpos a nivel de la unión dermoepidérmica. Se explicaran aquí las más importantes, y por ello no se comentarán el lupus eritematoso ampolloso (Gammon y Briggaman, 1993), el penfigoide anti-p105 (Chan y cols., 1993), y la nueva enfermedad ampollosa subepidérmica con autoanticuerpos contra una proteína dérmica de 200-kDa (Zillikens y cols., 1996) por ser muy infrecuentes. Tampoco se hará mención a la dermatitis herpetiforme (Smith y Zone, 1993) dado que a pesar de incluirse clásicamente en este grupo de enfermedades no debe de considerarse una “enfermedad ampollosa autoinmune subepidérmica” propiamente dicha al no presentar autoanticuerpos dirigidos contra la membrana basal.

2.1.1. Penfigoide Ampolloso

El penfigoide ampolloso fue descrito por primera vez por Lever en 1953 como una enfermedad ampollosa subepidérmica que se observaba sobretodo en personas ancianas (Lever, 1953). Suele manifestarse en forma de ampollas tensas que se desarrollan sobre zonas de piel eritematosa o sobre lesiones urticariformes. En algunos enfermos puede ser una enfermedad localizada, pero en general las lesiones aparecen a nivel de todo el tegumento, aunque tienen predilección por algunas zonas determinadas como son la cara interna de los muslos y áreas intertriginosas. Histológicamente se observan ampollas subepidérmicas con la presencia de un infiltrado inflamatorio dérmico superficial compuesto por eosinófilos,

neutrófilos, linfocitos e histiocitos (Lever, 1953).

Autoanticuerpos

El examen de piel perilesional utilizando inmunofluorescencia directa demuestra la presencia de depósitos lineares de IgG y/o complemento a nivel de la membrana basal dermoepidérmica. Cuando se emplean técnicas de inmunofluorescencia indirecta se puede demostrar la presencia de autoanticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal en el suero de la mayoría de los pacientes. Así, aproximadamente un 80% de pacientes con un penfigoide ampuloso en fase activa tendrá anticuerpos de tipo IgG contra la membrana basal utilizando técnicas rutinarias de inmunofluorescencia indirecta (Jordon y cols., 1967). La presencia de depósitos lineares de IgG a nivel de la membrana basal a pesar de ser típica del penfigoide ampuloso no es, sin embargo, específica de esta enfermedad ya que pueden encontrarse también en el herpes gestationis, penfigoide cicatricial o en la epidermolisis ampulosa adquirida entre otras. En el caso de las dos primeras enfermedades, la clínica ayudará normalmente a realizar un diagnóstico correcto, mientras que en el caso de la epidermolisis ampulosa adquirida los anticuerpos circulantes anti-membrana basal dermoepidérmica pueden ser diferenciados de los del penfigoide ampuloso mediante inmunomicroscopía electrónica indirecta o bien mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando piel separada a nivel de la lámina lucida con cloruro sódico 1 Molar. Con ésta técnica, los anticuerpos se unen al techo (lado epidérmico) o al techo y al suelo de la separación en el caso del penfigoide ampuloso. Por otra parte, en el caso de la epidermolisis ampulosa adquirida los anticuerpos sólo se unirán al suelo (lado dérmico) de la separación (Gammon y cols., 1984). En algunas ocasiones puede ser necesario utilizar técnicas de inmunoblot para diferenciar entre estas dos enfermedades: En el caso de pacientes con penfigoide ampuloso se

observará que los anticuerpos reconocerán al antígeno BP230, y menos a menudo al antígeno BP180, cuando se utilicen extractos epidérmicos, mientras que en el caso de la epidermolisis ampullosa adquirida los anticuerpos reaccionarán con unas bandas proteicas de 290 y 145-kDa cuando se utilicen extractos dérmicos.

Autoantígenos

Utilizando técnicas de inmunoprecipitación e inmunoblot, Stanley y cols. fueron los primeros investigadores que identificaron un polipéptido de 220-240-kDa (BP230) como el antígeno que reconocían los autoanticuerpos de pacientes con penfigoide ampuloso (Stanley y cols., 1981 y 1984a). Más adelante, Labib y cols. (Labib y cols., 1986) demostraron que la respuesta autoinmune de estos pacientes era heterogénea al identificar una proteína de 180-kDa, BP180, que también era reconocida por un alto porcentaje de sueros de penfigoide ampuloso. Posteriormente, utilizando los anticuerpos de los pacientes se ha podido clonar y secuenciar el ADN complementario de ambas proteínas, y caracterizarlas a nivel molecular (Stanley y cols., 1988; Diaz y cols., 1990; Tanaka y cols., 1991a; Sawamura y cols., 1991; Giudice y cols., 1992). BP230 es una proteína intracelular que se localiza a nivel de la placa hemidesmosómica (Klatte y cols., 1989; Tanaka y cols., 1990). El gen que codifica esta proteína se ha podido localizar a nivel del locus cromosómico 6p12-p11 (Tanaka y cols., 1991a; Sawamura y cols., 1991). BP180, por el contrario, es una proteína *transmembrana* con una orientación de tipo II, es decir, la región aminoterminal se halla localizada dentro de la célula, mientras que la porción carboxiterminal se proyecta hacia el medio extracelular (Giudice y cols., 1991; Hopkinson y cols., 1992; Nishikawa y cols., 1993; Giudice y cols., 1993). Se trata de una molécula de tipo colágeno, y recientemente se ha demostrado que forma una triple hélice colágena (Hirako y cols., 1996). El gen para BP180 se ha localizado a nivel

del locus cromosómico 10q24.3 (Li y cols., 1991).

Utilizando proteínas de fusión bacterianas se han podido identificar diferentes epítomos a nivel de la región extracelular de BP180. Así, existiría un epítomo inmunodominante (que se denominó inicialmente MCW-1) localizado en la región NC16A (región no colágena 16) reconocido por gran parte de los sueros de penfigoide ampuloso y de herpes gestationis (Giudice y cols., 1993). Se ha visto también que este epítomo, así como la región carboxiterminal, es reconocidos por sueros de pacientes con penfigoide cicatricial (Balding y cols., 1995). Más recientemente se ha podido demostrar que la gran mayoría de pacientes con penfigoide ampuloso poseen anticuerpos dirigidos exclusivamente contra una región de 45 aminoácidos localizada en NC-16A, y que a parte del epítomo MCW-1 existirían otros epítomos inmunodominantes adicionales (Zillikens y cols., 1997a). Estos estudios han permitido desarrollar métodos de ELISA para el diagnóstico de penfigoide ampuloso y otras enfermedades ampollosas con anticuerpos contra BP180 utilizando las proteínas de fusión que contienen estos epítomos. El primero de estos ELISA utilizaba una proteína que sólo contenía el epítomo MCW-1 y permitió detectar autoanticuerpos en un 58% de pacientes con penfigoide ampuloso con una especificidad del 97% (Giudice y cols., 1994). En el segundo método de ELISA hemos utilizado una proteína de fusión que contiene los epítomos adicionales mencionados anteriormente y tendría una sensibilidad del 94% con una especificidad del 97% (Zillikens y cols., 1997b).

Patogenia

Todos estos estudios anteriores permitieron desarrollar además un modelo animal de la enfermedad. A diferencia de lo que sucedió con el pénfigo vulgar y el pénfigo foliáceo, todas las tentativas de inducir enfermedad en animales mediante la transferencia pasiva de IgG de pacientes con

penfigoide ampuloso fueron infructuosas. A pesar de que los anticuerpos de penfigoide podían detectarse en el suero de los ratones inyectados éstos no eran capaces de unirse a la unión dermoepidérmica de los animales. (Anhalt y Diaz, 1987). Estos resultados sugirieron que la epidermis murina no contenía los epítomos reconocidos por los anticuerpos patógenos en el hombre. Para investigar esta hipótesis se identificó la secuencia correspondiente al epítomo MCW-1 humano en el antígeno BP180 murino (Liu, y cols., 1993b). Al comparar ambas secuencias se objetivó que existían importantes diferencias en esta región del epítomo MCW-1 (véase la **FIGURA 5**). Utilizando formas recombinantes de la proteína BP180 humana y murina se demostró que los anticuerpos dirigidos contra MCW-1 no reconocían al BP180 murino. Esto explicaba el porqué no podía estudiarse la patogenicidad de estos autoanticuerpos utilizando un modelo murino de transferencia pasiva convencional. Como alternativa se produjeron anticuerpos policlonales en conejos contra el segmento del BP180 murino que comprendía la región homóloga al epítomo humano MCW-1. Los anticuerpos reconocían al BP180 murino por inmunoblot y teñían la unión dermoepidérmica de la piel de ratón cuando se realizaba una inmunofluorescencia indirecta. Entonces se inyectaron estos anticuerpos a ratones recién nacidos (Liu y cols., 1993b). Los ratones presentaron una enfermedad ampulosa que reprodujo fielmente todas las características del penfigoide ampuloso: ampollas subepidérmicas clínicas e histológicas, infiltrados inflamatorios en la dermis superficial y media, y depósitos de IgG y complemento en la unión dermoepidérmica. Además, el efecto patógeno de los anticuerpos dependía de la dosis administrada: a mayor dosis de anticuerpos mayor extensión y severidad de la enfermedad en los ratones inyectados.

Este mismo modelo ha permitido caracterizar los mecanismos inmunológicos de este modelo animal de enfermedad ampulosa autoinmune

subepidérmica. Más concretamente, ha permitido estudiar el papel del sistema del complemento en la fisiopatología del penfigoide experimental (Liu, y cols., 1995). Se ha demostrado así que la IgG de conejo anti-BP180 murino es capaz de producir enfermedad en ratones normales, pero no en ratones con déficit genético de la fracción C5. Además, si se inyecta estos anticuerpos a ratones recién nacidos de tipo BALB/c en los cuales se ha inactivado el sistema del complemento mediante la inyección previa de veneno de cobra estos tampoco desarrollan enfermedad. Finalmente, si se inyectan ratones normales con la fracción F(ab')₂ de la IgG anti-BP180 murino (que carecerá de porción Fc y por lo tanto no será capaz de activar el complemento) estos tampoco desarrollan enfermedad. Todos estos resultados indican que la activación del complemento es un paso imprescindible para que los anticuerpos den lugar a enfermedad en este modelo experimental de penfigoide.

Se ha demostrado además que los ratones recién nacidos depleccionados de neutrófilos (mediante tratamiento previo con un suero anti-neutrófilo) son resistentes al efecto patógeno de los anticuerpos anti-BP180 murino (Liu y cols., 1997). La ausencia de formación de ampollas en estos animales correlacionó con la disminución de infiltrado inflamatorio neutrofílico en la piel. Todos estos datos permiten concluir que las ampollas subepidérmicas que se observan en este modelo animal (y por lo tanto en el penfigoide ampoloso) son desencadenadas por los anticuerpos anti-BP180 y que dependen de la activación del complemento y la infiltración por neutrófilos.

2.1.2. Herpes Gestationis

El herpes gestationis o penfigoide gestacional es una enfermedad ampollosa infrecuente que suele aparecer durante el embarazo, aunque se han

descrito algunos casos asociados a tumores derivados del trofoblasto como son la mola hidatídica o el coriocarcinoma (Shornick y cols., 1983). Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de una erupción vesículo-ampollosa intensamente pruriginosa que suele aparecer en el segundo trimestre del embarazo. Las lesiones son placas urticariformes sobre las cuales aparecen más adelante lesiones ampollosas tensas. La erupción suele iniciarse en la región periumbilical y luego se extiende al abdomen, muslos y pechos. Las lesiones mucosas son muy raras. Histológicamente suele observarse un edema de la dermis papilar con focos inflamatorios perivasculares y espongirosis epidérmica con abundantes eosinófilos. En las lesiones más evolucionadas se observan ampollas subepidérmicas con numerosos eosinófilos. Estas lesiones son difíciles de distinguir de las del penfigoide ampollosa excepto por la presencia ocasional de necrosis de los queratinocitos basales.

Autoanticuerpos

El examen con inmunofluorescencia directa muestra depósitos lineares de C3 a lo largo de la membrana basal dermoepidérmica en todas las pacientes con enfermedad activa. Se pueden hallar depósitos de IgG en un 20% de los casos (Shornick y cols., 1983). Se pueden detectar anticuerpos circulantes de tipo IgG dirigidos a la membrana basal dermoepidérmica utilizando técnicas rutinarias de inmunofluorescencia indirecta en un 25% de las enfermas. Sin embargo, si se emplea una técnica de inmunofluorescencia indirecta con fijación del complemento, se podrá demostrar la presencia de anticuerpos en el suero de alrededor de un 90% de los casos.

Autoantígeno

Cuando se utilizan técnicas de inmunoblot la mayoría de las pacientes con herpes gestationis reconocen al antígeno BP180 (Morrison y cols., 1988).

Estudios posteriores utilizando proteínas de fusión bacterianas han demostrado que un 88% de los sueros de herpes gestationis reconocen esta proteína (Diaz y cols., 1990). Más adelante, en el estudio en el que se identificó el epítipo inmunodominante MCW-1 de la región extracelular de BP180 se vio que el 100% de los sueros de herpes gestationis reconocía este epítipo (Giudice y cols., 1993). Todos estos datos confirman que los sueros de las pacientes con herpes gestationis reconocen BP180.

Patogenia

Se desconoce en la actualidad cual es la patogenia del herpes gestationis. Se sabe que es una erupción que aparece en el embarazo y que suele recidivar en gestaciones posteriores. No se ha podido demostrar que los autoanticuerpos de las pacientes sean patógenos. Sin embargo, estos están mayoritariamente dirigidos contra BP180 y por ello el modelo experimental de penfigoide ampuloso comentado anteriormente puede también ser visto como un modelo experimental de herpes gestationis, en el que se demuestra el papel patógeno de los autoanticuerpos.

2.1.3. Penfigoide Cicatricial

El penfigoide cicatricial es una enfermedad ampulosa crónica que afecta predominantemente a las mucosas y que característicamente produce cicatrices (Ahmed y cols., 1991; Mutasim y cols., 1993b). Los pacientes con penfigoide cicatricial suelen presentar ampollas tensas que se rompen fácilmente dando lugar a erosiones a nivel de las mucosas, y en menor grado a nivel de la piel. La mucosa oral (80-90%) y la conjuntival (50-70%) son las que se afectan más a menudo. No es habitual que aparezcan cicatrices residuales a nivel oral. Por el contrario, las lesiones oculares tienen una tendencia insidiosa a la cicatrización conjuntival: aparecen tractos fibrosos

que unen las conjuntivas bulbar y palpebral que pueden dar lugar a la formación de simblefarón, obliteración total de los sacos conjuntivales (anquilloblefarón), entropión, triquiasis, queratopatía superficial y úlceras corneales. Todas estas combinaciones pueden provocar finalmente opacidades corneales con disminución de la agudeza visual, pudiendo llevar a la ceguera que suele ser bilateral (Person y Rogers, 1977). La piel se suele afectar en un 25% de los casos. Las ampollas son escasas y suelen aparecer sobre placas eritematosas en la cabeza, cuello o el tronco. Curan dejando cicatrices atróficas y quistes de milium. No suele haber prurito. También pueden afectarse otras mucosas, incluyendo la genital (15%), nasal (15%), laríngea (8%), anal (4%) y esofágica (4%). El examen histológico de las lesiones cutáneas de penfigoide cicatricial muestra ampollas subepidérmicas con un infiltrado inflamatorio dérmico mixto formado por linfocitos, células mononucleares, neutrófilos y algún eosinófilo (Mutasim y cols., 1993b).

Autoanticuerpos

En 80 a 95% de las biopsias, la inmunofluorescencia directa es capaz de demostrar la presencia de depósitos lineares de inmunoglobulinas y complemento a lo largo de la membrana basal de la piel, mucosa oral o conjuntiva (Leonard y cols., 1988; Kelly y Wojnarowska , 1988; Setterfield y cols., 1995). Estos depósitos se observan más a menudo a nivel de las biopsias de mucosas que en las de piel, siendo la IgG la inmunoglobulina que se detecta con mayor frecuencia, aunque también se puede detectar IgA e IgM (Setterfield y cols., 1995). Los estudios de inmunofluorescencia de las biopsias de conjuntiva muestran los mismos tipos de depósito a lo largo de la membrana basal, y recientemente se ha visto que la utilización de técnicas inmunohistoquímicas con peroxidasa aumenta la sensibilidad de la detección de inmunorreactantes en la conjuntiva (Power y cols., 1995).

La presencia de anticuerpos circulantes contra la membrana basal dermoepidérmica por inmunofluorescencia indirecta sólo se puede demostrar en un 20% de los pacientes con penfigoide cicatricial. En general, los títulos de anticuerpos suelen ser bajos y la mayoría de los pacientes tienen autoanticuerpos circulantes de tipo IgG aunque en algunos casos éstos son de tipo IgA (Sarret y cols, 1991). Si para realizar la inmunofluorescencia indirecta se utilizan otros sustratos (mucosa oral humana, conjuntiva humana, esófago de conejo) se puede incrementar la sensibilidad de la técnica hasta el 80%. La realización de la inmunofluorescencia indirecta utilizando piel humana separada con cloruro sódico también aumenta la sensibilidad de la detección de anticuerpos circulantes. En la mayoría de los casos se observa que los anticuerpos de tipo IgG se unen al lado epidérmico de la separación, aunque también puede observarse en algunos casos la unión al lado dérmico o a ambos lados de la separación. Empleando técnicas de inmunomicroscopía electrónica indirecta se ha demostrado que en el penfigoide cicatricial existen dos zonas diferentes donde se depositan los autoanticuerpos: En aquellos sueros que tiñen la parte epidérmica de la piel separada con cloruro sódico se observa que los anticuerpos se unen a la región situada entre los hemidesmosomas y la membrana plasmática de los queratinocitos basales; por otra parte, en aquellos sueros que tiñen la parte dérmica de la piel separada, los anticuerpos se unen a la interfase entre la lámina lucida y la lámina densa (Shimizu y cols., 1995).

Autoantígenos

El penfigoide cicatricial es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista inmunológico, y se han identificado varios antígenos de la membrana basal a los que se pueden unir los anticuerpos de los pacientes. Dada esta heterogeneidad antigénica se cree que el penfigoide cicatricial más que una

enfermedad individualizada es un fenotipo clínico que puede corresponder a distintas enfermedades. Cuando se utilizan técnicas de inmunoblot e inmunoprecipitación, la mayoría de sueros de penfigoide cicatricial reconocen el antígeno BP180, mientras que un pequeño porcentaje reconoce al antígeno BP230 (Bernard y cols., 1990 y 1992; Balding y cols., 1996). Recientemente se ha descrito un pequeño grupo de pacientes con penfigoide cicatricial cuyo suero tiñe la parte dérmica de la piel separada, y cuyos anticuerpos reaccionan con la laminina 5, un componente de las fibras de anclaje (Domloge-Hultsch y cols., 1992 y 1994). Estos anticuerpos se unen específicamente a la subunidad α de esta proteína (Kirtschig y cols., 1995), aunque también existen casos que se unen a la subunidad β (Ghohestani y cols., 1997b). También se ha descrito que algunos sueros reaccionan con una proteína epidérmica de 120-kDa aún no identificada (Sarret y cols., 1989), contra proteínas de 230, 205 y 160-kDa (Mohimen y cols., 1993), y que algunos pacientes tienen anticuerpos de tipo IgA que reaccionan con una proteína epidérmica de 45-kDa (Smith y cols., 1993).

Patogenia

La patogenia del penfigoide cicatricial no está clara. La mayoría de los pacientes tiene anticuerpos contra BP180, y se ha demostrado que los sueros de penfigoide cicatricial reconocen al menos dos epítomos diferentes a nivel de la región extracelular de BP180 (Balding y cols., 1996). Uno de ellos estaría situado a nivel del dominio no colágeno NC16A y el otro a nivel del extremo carboxilo. A pesar de que existe un modelo experimental de penfigoide ampuloso comentado anteriormente, no existen en el momento actual evidencias de que los anticuerpos anti-BP180 de los pacientes con penfigoide cicatricial sean patógenos. Por lo que respecta a la laminina 5, recientemente se ha logrado provocar la aparición de ampollas subepidérmicas en ratones recién nacidos tras la administración de

anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra la laminina 5 humana (Lazarova y cols., 1996). Esto constituiría un modelo experimental para esta enfermedad, y una evidencia indirecta de la patogenicidad de los anticuerpos de este grupo de pacientes.

2.1.4. Epidermolisis Ampollosa Adquirida

La epidermolisis ampollosa adquirida es una enfermedad ampollosa infrecuente que afecta principalmente a zonas de roce o traumatismos. Se han descrito varias formas distintas de esta enfermedad. En primer lugar tenemos la forma clásica, que se caracteriza clínicamente por la aparición de vesículas y ampollas a nivel de zonas de roce o traumatismo (dorso de manos, nudillos, codos, rodillas, tobillos, dedos de los pies) que aparecen sobre una piel sin signos previos de inflamación (Gammon y Briggaman, 1993). Dichas lesiones se resuelven dejando cicatrices y quistes de milium sobre las superficies afectadas. Ésta forma de presentación puede ser indistinguible de otras enfermedades dermatológicas como una porfiria cutánea tarda o algunas formas de epidermolisis ampollosa distrófica hereditaria. Existe, por el contrario, una forma inflamatoria de epidermolisis ampollosa adquirida que se manifiesta en forma de una erupción más o menos generalizada de ampollas tensas sobre una base inflamatoria. Puede ser clínicamente indistinguible de un penfigoide ampolloso apareciendo eritema, placas urticariformes y prurito intenso. Finalmente, existe una forma de esta enfermedad que recuerda un penfigoide cicatricial porque en ella la afectación de las mucosas es lo más prominente. En este pequeño grupo de pacientes la enfermedad afecta principalmente a las mucosas oral, nasal, ocular, laríngea y esofágica (Stewart y cols., 1991).

Cuando se practica una biopsia en la epidermolisis ampollosa adquirida los cambios observados dependen de la forma clínica de que se trate. En la

forma clásica de la enfermedad se observan ampollas subepidérmicas con un infiltrado inflamatorio muy escaso tanto a nivel de las ampollas como en la dermis. En la forma inflamatoria, por el contrario, se observan unos infiltrados densos con presencia de células mononucleadas y neutrófilos (Gammon y Briggaman, 1993).

Autoanticuerpos

Si se practica un examen de inmunofluorescencia directa de piel perilesional podrá ponerse de manifiesto la presencia de depósitos lineares de IgG y de C3 a lo largo de la membrana basal dermoepidérmica. Se pueden también detectar depósitos de complemento, IgM e IgA. Los depósitos suelen ser más intensos que los que se observan en el penfigoide ampolloso, aunque esto no es un criterio suficiente para establecer el diagnóstico. Utilizando inmunofluorescencia indirecta se pueden detectar anticuerpos circulantes de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal en el suero de un 50% de los pacientes. La sensibilidad de esta técnica aumenta mucho si se utiliza como substrato piel humana separada con cloruro sódico 1 M. Con este procedimiento los autoanticuerpos de los pacientes con epidermolisis ampollosa adquirida se unen exclusivamente a la parte dérmica de la separación (Gammon y cols., 1984). Este patrón es sugestivo del diagnóstico de epidermolisis ampollosa adquirida pero sin embargo no es específico (Ghohestani y cols., 1997b), ya que existen otras enfermedades con el mismo patrón como son el penfigoide cicatricial anti-laminina 5 (Domloge-Hultsch y cols., 1994), el penfigoide anti-p105 (Chan y cols., 1993), y una nueva enfermedad ampollosa subepidérmica con autoanticuerpos contra una proteína dérmica de 200-kDa (Zillikens y cols., 1996). Cuando se realiza una microscopía inmunoelectrónica directa o indirecta, los depósitos de inmunoglobulinas se localizan por debajo de la lámina densa (sublamina densa), a nivel de las fibrillas de anclaje (Ishiko y cols., 1996a).

Autoantígeno

La epidermolisis ampullosa adquirida es una enfermedad autoinmune contra el colágeno VII. Cuando se realiza un estudio por inmunoblot utilizando extractos dérmicos el suero de estos pacientes reconoce una proteína dérmica de 290-kDa (Woodley y cols., 1984). Esta banda corresponde a la cadena α del colágeno tipo VII. A menudo se observa también una segunda banda (que puede a veces ser la única detectable) de unos 145-kDa que corresponde a un fragmento menor de la molécula. Mediante inmunoblot se observa que los anticuerpos circulantes en el suero de los pacientes se unen a una o a ambas bandas (Woodley y cols., 1984). Sin embargo, los resultados de esta técnica se hallan limitados por los títulos bajos de anticuerpos circulantes, por lo que un resultado negativo no excluye el diagnóstico de la enfermedad. Utilizando diferentes proteínas de fusión se ha demostrado que la mayoría de los anticuerpos de pacientes con epidermolisis ampullosa adquirida se hallan dirigidos contra la región no-colágena (NC) 1 que se halla a nivel del extremo amino-terminal de la molécula de colágeno VII (Lapière y cols., 1993). En la actualidad se han diseñado tests de ELISA utilizando diferentes proteínas recombinantes representando partes de la región no colágena del colágeno VII con una elevada sensibilidad y especificidad (Chen y cols., 1997; Jones y cols., 1995).

Patogenia

Se desconoce aún cual es el papel de los autoanticuerpos contra el colágeno VII en esta enfermedad. Se ha sugerido que quizás alteren la estabilidad del colágeno VII en las fibrillas de anclaje o que interfieran con las interacciones de esta proteína con otras moléculas de la matriz extracelular. No se ha demostrado aún que estos anticuerpos sean patógenos a pesar de que han

existido ya varias tentativas de realizar la transferencia pasiva de los autoanticuerpos a animales de experimentación (Borradori y cols., 1995).

2.1.5. Enfermedad Ampollosa IgA Linear

El diagnóstico de enfermedad ampollosa IgA linear se suele realizar cuando se observa un predominio de los depósitos lineares de IgA a lo largo de la membrana basal por inmunofluorescencia directa. Clínica e histológicamente es muy parecida a la dermatitis herpetiforme (Smith y Zone, 1993), y fueron Chorzelski y colaboradores los primeros en diferenciar a esta enfermedad de la dermatitis herpetiforme (Chorzelski y cols., 1979). Tiene una distribución bimodal, siendo más frecuente por debajo de los 5 años y alrededor de la quinta década. Los casos infantiles corresponderían a la llamada "enfermedad ampollosa crónica de la infancia" y recientemente se ha demostrado que reconocen el mismo antígeno que la IgA linear del adulto (Zone y cols., 1996).

El cuadro clínico puede ser muy variable. Las lesiones cutáneas son vesículas y ampollas tensas que pueden aparecer sobre piel sana o bien sobre piel eritematosa, distribuyéndose a menudo en la periferia formando las lesiones "en collar de perlas" que se dice que son muy características. Suelen aparecer a nivel del periné, región perioral, y en las extremidades, pero también pueden ser generalizadas. Suele existir prurito. El cuadro clínico puede evocar un penfigoide ampolloso, una dermatitis herpetiforme o bien una epidermolisis ampollosa adquirida. En adultos, la mucosas se afectan a menudo, sobretodo la bucal (37%), la genital (25%) y la conjuntival (20%), donde pueden aparecer cicatrices. Las lesiones oculares pueden ser indistinguibles de las de un penfigoide cicatricial. Debido a su frecuencia y que a menudo son inicialmente asintomáticas, será preciso realizar siempre un examen oftalmológico detallado en todo paciente con una enfermedad ampollosa IgA linear (Aultbrinker y cols., 1988). Se ha descrito la aparición de

enfermedad ampollosa IgA linear inducida por vancomicina (Whitworth y cols., 1996), aunque también se han implicado otros fármacos.

El examen histológico de las lesiones en la enfermedad ampollosa IgA linear muestra ampollas subepidérmicas con infiltrados inflamatorios en la dermis. Este puede ser rico en eosinófilos o bien neutrófilos. En este último caso los neutrófilos pueden formar microabcesos papilares idénticos a los que se observan en la dermatitis herpetiforme.

Autoanticuerpos

Tal como indica el nombre, la inmunofluorescencia directa de la piel muestra depósitos lineales de IgA a lo largo de la membrana basal, con o sin presencia de depósitos de complemento. En algunos casos, sin embargo, pueden encontrarse también depósitos de IgG. Sólo un pequeño porcentaje de pacientes adultos y en la mayoría de los casos infantiles es posible demostrar la presencia de autoanticuerpos circulantes de tipo IgA contra la membrana basal, casi siempre a títulos bajos. La sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta aumenta cuando se utiliza piel separada con cloruro sódico (Wojnarowska y cols., 1995). Los anticuerpos suelen unirse al lado epidérmico de la separación (Zone y cols., 1990), aunque también pueden unirse al lado dérmico (Rusenko y cols., 1989), o bien a ambos lados de la separación (Willstead y cols., 1990). Cuando se realizan estudios de microscopía inmunoelectrónica indirecta los depósitos de inmunoglobulinas pueden observarse a nivel de la lámina lucida o de la sublámina densa (Kowalewski y cols., 1995).

Autoantígenos

La realización de estudios de inmunoblot ha permitido identificar distintas proteínas inmunorreactivas. En primer lugar, Zone y colaboradores han observado que los sueros de pacientes con enfermedad ampollosa IgA linear

y enfermedad ampollosa crónica de la infancia tiñen el lado epidérmico de la piel separada con cloruro sódico y reconocen una proteína epidérmica de 97-kDa (Zone y cols., 1990 y 1996). Al realizar estudios de microscopía inmunoelectrónica indirecta con sueros que reconocían al antígeno de 97-kDa se pudo ver que dicho antígeno se situaba a nivel de la lámina lúcida por debajo de los hemidesmosomas y quizás a nivel de las placas hemidesmosómicas (Ishiko y cols., 1996b). Recientemente se ha caracterizado la proteína de 97-kDa y se la ha denominado LAD-1 (Marinkovich y cols., 1996). Es sintetizada y secretada por los queratinocitos y puede detectarse en la membrana basal de distintos tejidos donde se localiza exclusivamente a nivel de los filamentos de anclaje. Los queratinocitos secretan una proteína de 120-kDa y ésta probablemente es degradada hasta 97-kDa durante los procesos de extracción tisular. Trabajos recientes sugieren que esta proteína es idéntica o se halla estrechamente relacionada con BP180 (Pas y cols., 1997; Zone y cols. 1997). Otros antígenos diana que se han descrito han sido BP230 (Ghohestani y cols., 1997a), BP180 (Darling y cols., 1995; Ghohestani y cols., 1997), o el colágeno VII (Caux y cols., 1997; Rusenko y cols., 1989).

Patogenia

La patogenia de la enfermedad ampollosa IgA linear se desconoce en el momento actual. El primer paso será establecer claramente cual(es) es el antígeno diana en esta enfermedad. En el caso de aquellos pacientes cuyos anticuerpos están dirigidos contra la LAD-1, se ha visto que un anticuerpo monoclonal que reconoce esta proteína (mAb123) es capaz de producir una separación dermoepidérmica *in vitro* utilizando piel humana (Marinkovich y cols., 1996). Sin embargo, no existe hasta el momento un modelo animal y los experimentos de transferencia pasiva se hallan limitados por el hecho que los títulos de anticuerpos en los pacientes suelen ser siempre muy bajos.

2.2. Enfermedades Ampollosas Autoinmunes Intraepidérmicas (Pénfigos)

El término *pénfigo* se aplica a un grupo de enfermedades ampollosas de la piel caracterizadas por una pérdida de cohesión de los queratinocitos epidérmicos entre sí que da lugar a la formación de ampollas intraepidérmicas. Este fenómeno es lo que se conoce con el término de acantolisis y fue descrito por primera vez por Auspitz en el año 1880. A pesar de ello, este descubrimiento quedó en el olvido hasta el año 1943 en que Achille Civatte volvió a describir este fenómeno y separó el grupo de los pénfigos de la llamada *dermatitis polimorfa de Duhring y Brocq* (Civatte, 1943). Este grupo de enfermedades se caracteriza además por la presencia en el suero de los pacientes de autoanticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la superficie celular de los queratinocitos (Stanley, 1993).

2.2.1. Pénfigo Vulgar

En la mayoría de los enfermos con pénfigo vulgar las primeras lesiones aparecen a nivel de la mucosa oral y puede que durante varios meses se limiten a esta localización hasta que aparezcan lesiones a nivel de la piel. Las lesiones cutáneas son una ampollas frágiles que se rompen fácilmente y aparecen sobre piel sana no eritematosa. Al romperse estas ampollas dejan unas erosiones que tardan en curar y forman costras. Si la enfermedad sigue su curso sin tratamiento estas erosiones confluyen dando lugar a amplias zonas denudadas con poca tendencia a curar espontáneamente. El examen histopatológico de estas lesiones muestra una separación de los queratinocitos epidérmicos entre sí (acantolisis) que da

lugar a la formación de ampollas intraepidérmicas. En el caso del pénfigo vulgar las ampollas aparecen justo por encima de la capa de queratinocitos basales (ampollas suprabasales), quedando los queratinocitos basales en el fondo y dando lugar a una imagen característica que se ha comparado a las lápidas de un cementerio.

Autoanticuerpos

Si se realiza una inmunofluorescencia directa de piel perilesional pueden observarse depósitos de IgG y/o complemento a nivel de la superficie de los queratinocitos. Además, por inmunofluorescencia indirecta puede demostrarse la presencia de anticuerpos circulantes dirigidos contra los espacios intercelulares de la epidermis en un 80 a 85 % de los casos (Mascaró y cols., 1996a).

Patogenia

Diversas evidencias tanto clínicas como experimentales demuestran que los anticuerpos de los pacientes con pénfigo vulgar son patógenos y probablemente son los responsables de la enfermedad. En primer lugar, existen algunas descripciones en la literatura de recién nacidos hijos de madres con pénfigo vulgar que desarrollaron una enfermedad ampollosa autolimitada debido al paso transplacentario de anticuerpos maternos. En segundo lugar, en 1976 Schiltz y Michel demostraron que la fracción IgG purificada del suero de pacientes con pénfigo vulgar cuando se añadía al medio de piel total en cultivo era capaz de inducir la separación de las células y acantolisis (Schiltz y Michel, 1976). Finalmente, la patogenicidad de los anticuerpos del pénfigo vulgar quedó demostrada definitivamente cuando se pudo reproducir la enfermedad en animales de experimentación mediante la transferencia pasiva de la fracción IgG del suero de pacientes (Anhalt y cols., 1982). En dicho modelo experimental los anticuerpos fueron

inyectados por vía intraperitoneal o subcutánea a ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Estos anticuerpos se unieron entonces a los espacios intercelulares de la epidermis y, al cabo de 18 a 24 horas de la inyección inicial, los ratones desarrollaron una enfermedad ampollosa con todas las características clínicas, histológicas e inmunopatológicas del pénfigo vulgar humano. En dicho modelo animal experimental pudo observarse también que existía una buena correlación entre la extensión de la enfermedad producida en los animales y el título de los anticuerpos en las fracciones de IgG inyectadas. Existía, asimismo, una clara relación entre el grado de enfermedad que desarrollan los animales y el título de anticuerpos circulantes en su suero.

Autoantígeno

Stanley y cols. fueron los primeros que demostraron que los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con pénfigo vulgar eran capaces de inmunoprecipitar un complejo de 210-kDa a partir de extractos epidérmicos marcados con isótopos radioactivos (Stanley y cols., 1982, 1984b). Éste complejo estaba formado por dos polipéptidos que se hallaban unidos covalentemente: una proteína de 130-kDa que inicialmente se designó como "antígeno del pénfigo vulgar", y otra de 85-kDa que fue identificada más tarde como la placoglobina, una de las proteínas de la placa desmosómica (Korman y cols., 1989). En estudios posteriores se objetivó que éste "antígeno del pénfigo vulgar" de 130-kDa también podía detectarse mediante técnicas de inmunoblot utilizando distintos substratos solubilizados en sodio-dodecil-sulfato (SDS) (Hashimoto y cols., 1990). Finalmente, utilizando el suero de pacientes con pénfigo vulgar se pudo clonar y secuenciar el ADN complementario de este "antígeno del pénfigo vulgar" (Amagai y cols., 1991). Pudo observarse así que dicha proteína presentaba similitudes importantes con la familia de las cadherinas, un

grupo de moléculas de adhesión celular cuya función depende de la presencia de calcio. Se vio que el "antígeno del pénfigo vulgar" tenía una homología del 60% con una de las cadherinas de la epidermis denominada desmogleína 1, y por dicho motivo se escogió el nombre de desmogleína 3 (Buxton y cols., 1993). En estudios posteriores se observó que la desmogleína 3 se hallaba a nivel de los desmosomas de los queratinocitos epidérmicos. Esto se demostró mediante la utilización de anticuerpos de conejo inmunizados con desmogleína 3 recombinante. Con ellos se pudo realizar estudios de inmunomicroscopía electrónica y se observó que los anticuerpos se fijaban a los desmosomas de queratinocitos en cultivo (Karpati y cols., 1993). El locus del gen de la desmogleína 3 ha sido localizado más adelante nivel del cromosoma 18 (Wang y cols., 1994).

La mayoría de los estudios actuales en el pénfigo vulgar se hallan encaminados a localizar epítomos inmunodominantes en la molécula de la desmogleína 3. Estos estudios se llevaron a cabo inicialmente mediante la utilización de proteínas bacterianas recombinantes de fusión que contenían varias regiones de esta proteína. Con esta metodología se pudo identificar varios epítomos importantes a nivel de la región aminoterminal del dominio extracelular de la desmogleína 3 (Amagai y cols., 1992). Además, utilizando las proteínas bacterianas recombinantes de fusión que contenían la porción aminoterminal de la desmogleína 3 se pudieron purificar, mediante cromatografía de afinidad, anticuerpos de pénfigo vulgar que eran capaces de inducir acantolisis al ser inyectados en ratones recién nacidos. Sin embargo, estas proteínas bacterianas recombinantes de fusión no fueron capaces de absorber todos los anticuerpos patógenos del suero de pacientes con pénfigo vulgar. Todos estos resultados sugirieron que a pesar de existir algunos epítomos a nivel de la región aminoterminal de la desmogleína 3 a los que se unían parte de los anticuerpos patógenos, debían existir otros epítomos (conformacionales o que estaban localizados

en otras partes de la molécula) que no se hallaban presentes en dichas proteínas bacterianas recombinantes. Dado que estas proteínas recombinantes sólo pueden expresar epítomos lineares y no son capaces de presentar la conformación adecuada de la desmogleína 3, el mismo grupo de investigadores decidió sintetizar una proteína recombinante utilizando un sistema eucariota de síntesis proteica. Para ello se empleó el sistema del baculovirus, en el cual unas líneas celulares de insecto son capaces de producir proteínas ajenas tras ser infectadas por un virus en cuyo ADN se introduce la secuencia de la proteína que se quiere sintetizar (en éste caso la porción extracelular de la desmogleína 3). De esta forma se pudo producir una proteína soluble que contenía la porción extracelular de la desmogleína 3 (Amagai y cols., 1994b). Dicha proteína reaccionó mediante inmunoblot con la mayoría de los sueros de pénfigo vulgar examinados, pero no con sueros normales o de otras enfermedades ampollasas. Además, en una proporción importante de los sueros de pénfigo vulgar se logró abolir o disminuir su reactividad con los espacios intercelulares epidérmicos tras incubar las muestras de suero con la proteína recombinante y luego realizar una inmunofluorescencia indirecta. Esta molécula fue además capaz de absorber la mayoría de los anticuerpos patógenos del suero de dos pacientes. Los ratones inyectados con la IgG de estos sueros (que habían sido previamente incubados con la proteína recombinante) no mostraron la presencia de ampollas clínicas aunque sí histológicas.

Los estudios de especificidad antigénica han permitido desarrollar métodos de ELISA para realizar el diagnóstico de pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo utilizando proteínas recombinantes. Así, en un estudio reciente en que se utilizaron desmogleína 1 y 3 recombinantes obtenidas mediante el sistema del baculovirus se pudo detectar anticuerpos contra la desmogleína 3 en el 94% de los sueros de pénfigo vulgar analizados (Ishii y cols., 1997).

Se ha observado que, al igual que los sueros de pacientes con

pénfigo foliáceo, alrededor de dos tercios de los sueros pacientes con pénfigo vulgar además de reaccionar con la desmogleína 3, inmunoprecipitan un complejo de polipéptidos de 260, 160 y 85-kDa correspondiente a la desmogleína 1 y a la placoglobina (Eyre y Stanley, 1988a). No se ha demostrado nunca, por el contrario, que los sueros de pénfigo foliáceo sean capaces de reconocer a la desmogleína 3. Utilizando proteínas bacterianas recombinantes de fusión que contenían distintas regiones de la desmogleína 1 bovina, un estudio sugirió que la mayoría de sueros de pénfigo vulgar con anticuerpos contra la desmogleína 1 sólo reconocerían la región intracelular de esta proteína (Dmochowski y cols., 1994). Sin embargo, en otro estudio en el que se utilizó una molécula de desmogleína 1 recombinante expresada a nivel de la superficie de una línea celular epitelial de mamífero (células COS-1) se observó que el 56% de los sueros de pénfigo vulgar estudiados reaccionaba con la región extracelular de la desmogleína 1 (Emery y cols., 1995). Mediante el test de ELISA descrito previamente en que se utilizaron moléculas recombinantes de desmogleína 1 y 3 para realizar el diagnóstico de pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo se observó la presencia de anticuerpos contra la desmogleína 1 en el 53% de los sueros de pénfigo vulgar (Ishii y cols., 1997). Es interesante además la observación realizada en este mismo estudio de que los pacientes que presentaban anticuerpos contra ambas desmogleínas (1 y 3) además de presentar lesiones en la mucosa oral solían tener lesiones cutáneas cuya extensión y severidad correlacionaba con los títulos de anticuerpos contra la desmogleína 1 (Ishii y cols., 1997).

En un estudio reciente nosotros también hemos podido observar que la respuesta autoinmune en el pénfigo vulgar es heterogénea (Ding y cols., 1997). Los epítomos reconocidos por algunos sueros serían específicos de especie mientras que otros parecen ser específicos de las mucosas, existiendo subgrupos de pacientes cuyos anticuerpos presentan

reactividades antigénicas distintas. En primer lugar se observó que un grupo de pacientes con lesiones localizadas exclusivamente a nivel de la mucosa oral presentaban sólo anticuerpos contra la desmogleína 3 pero no contra la desmogleína 1. Además el suero de estos enfermos no reconocía los espacios intercelulares de la epidermis murina y no era patógeno cuando fue inyectado a ratones recién nacidos. Por otra parte, todos los pacientes del grupo que presentaba lesiones cutáneas y mucosas tenían anticuerpos contra la desmogleína 3 y algunos también contra la desmogleína 1. El suero de estos enfermos reconoció los espacios intercelulares de la epidermis murina y fue capaz de inducir enfermedad en animales de experimentación cuando se empleó el modelo animal de transferencia pasiva. En una de las pacientes estudiadas se observó además que la evolución clínica de su enfermedad, que pasó de estar limitada a la mucosa oral a un cuadro generalizado con afectación de piel y mucosas, coincidió con la aparición de anticuerpos contra la desmogleína 1 (Ding y cols., 1997). Es interesante comentar también que se han descrito algunos pacientes con pénfigo vulgar que han presentado una evolución hacia un cuadro clínico característico de pénfigo foliáceo con acantolisis subcórnea y anticuerpos contra un polipéptido de 150-kDa (Iwatsuki y cols., 1991; Kawana y cols., 1994; Chang y cols., 1997). Además, en dos de estas pacientes se pudo objetivar como dicha transición se asociaba a un cambio de especificidad antigénica con anticuerpos contra un polipéptido de 130-kDa cuando el cuadro correspondía a un pénfigo vulgar y anticuerpos contra un polipéptido de 150-kDa cuando el cuadro evolucionó a pénfigo foliáceo (Kawana y cols., 1994). A pesar de todas estas observaciones hay que decir que en el momento actual se desconoce aún cual es el significado de esta reactividad con la desmogleína 1 que presentan algunos sueros de pacientes con pénfigo vulgar, así como cuál es su papel en la patogenia de la enfermedad.

En resumen, todos estos estudios sugieren que los autoanticuerpos

del suero de los pacientes con pénfigo vulgar están dirigidos principalmente contra la región extracelular de la desmogleína 3, y que son estos anticuerpos los responsables de iniciar y producir las lesiones cutáneas de los enfermos.

2.2.2. Pénfigo Foliáceo

En el pénfigo foliáceo las lesiones cutáneas primarias son unas ampollas superficiales que se rompen fácilmente dejando erosiones y costras superficiales. La enfermedad puede presentarse de forma localizada, o bien generalizada a modo de una dermatitis eritematodescamativa extensa y, en algunos casos, puede llegar a manifestarse como una eritrodermia exfoliativa. El examen histopatológico en el pénfigo foliáceo muestra unas ampollas acantolíticas intraepidérmicas localizadas a nivel del estrato granuloso, justo por debajo de la capa córnea.

Autoanticuerpos

La presencia de autoanticuerpos en el pénfigo foliáceo fue descrita por primera vez en 1968 por Beutner y cols. utilizando técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta (Beutner y cols., 1968). Estos autores demostraron que los pacientes con pénfigo foliáceo poseían unos anticuerpos que se unían a los espacios intercelulares de la epidermis, dando lugar a un patrón de inmunofluorescencia característico. Estos autoanticuerpos suelen demostrarse por inmunofluorescencia directa a nivel de la piel perilesional de los pacientes junto con depósitos de complemento. Son de tipo IgG y se ha observado que los títulos séricos correlaciona bien con la actividad y la extensión de la enfermedad (Squiquera y cols., 1988).

Patogenia

El papel patogénico de los anticuerpos antiepidérmicos de los pacientes con pénfigo foliáceo se halla bien establecido en la actualidad (Mascaró y Díaz, 1996). A pesar de que hasta hace poco distintos trabajos publicados habían recalcado la ausencia de enfermedad en recién nacidos hijos de madres con pénfigo foliáceo (Eyre y Stanley, 1988b; Rocha-Alvarez y cols., 1992), se han descrito recientemente dos casos de pénfigo foliáceo neonatal (Walker y cols., 1995; Anderson y cols., presentación oral). Esto demostraría que el paso transplacentario de los anticuerpos es capaz de inducir enfermedad en el feto. Además, se demostró en estudios *in vitro* que la IgG del suero de pacientes introducida en el medio de cultivo de células epidérmicas y de piel total era capaz de inducir la separación de los queratinocitos entre sí (Morioka y cols., 1987). Finalmente, se pudo demostrar de forma convincente que los autoanticuerpos de pacientes con pénfigo foliáceo eran patógenos *in vivo* utilizando el mismo modelo animal que se había utilizado en el pénfigo vulgar (Roscoe y cols., 1985). Así, cuando se inyecta la fracción IgG de pacientes con pénfigo foliáceo a ratones recién nacidos estos reproducen una enfermedad similar a la humana, tanto por lo que respecta a la clínica, como a la histología e inmunopatología. Rock y cols. demostraron en estudios posteriores que los autoanticuerpos en el pénfigo foliáceo son predominantemente de tipo IgG4, y que la IgG4 del suero de estos pacientes es también patógena cuando se inyecta a ratones recién nacidos (Rock y cols., 1989).

Autoantígeno

Stanley y cols. describieron que algunos sueros de pénfigo foliáceo reaccionaban con una proteína de 160-kDa al realizar inmunoblots utilizando extractos de epidermis (Stanley y cols., 1986). Más adelante, el mismo grupo de investigadores demostró que todos los sueros de pénfigo foliáceo

inmunoprecipitaban un complejo de 260-kDa cuando se utilizaban extractos de epidermis humana no desnaturalizados marcados con isótopos radioactivos (Eyre y Stanley, 1987). Este complejo estaba formado por la desmogleína 1 (160-kDa) y otro polipéptido de 85-kDa que más adelante fue identificado como la placoglobina (Korman y cols., 1989). Posteriormente, se describió la secuencia del ADN de la desmogleína 1, y se observó su gran similitud con otras proteínas pertenecientes a la familia de las cadherinas (Collins y cols., 1991; Koch y cols., 1991). Recientemente, Olague-Alcalá y cols. extrajeron el antígeno del pénfigo foliáceo de la epidermis bovina y lo emplearon para realizar inmunoprecipitaciones con sueros de pénfigo foliáceo (Olague-Alcalá y cols., 1994). Todos los sueros examinados inmunoprecipitaron un fragmento de 80-kDa que fue purificado y analizado. Se pudo identificar así su secuencia de aminoácidos, objetivándose su identidad con la porción aminoterminal de la desmogleína 1 (Mascaró y Diaz, 1996).

En los últimos años se han realizado varios estudios para determinar la localización de epítomos inmunodominantes a nivel de la molécula de desmogleína 1. En un primer estudio se analizó la reactividad de varios sueros de pénfigo foliáceo por inmunoblot utilizando unas proteínas bacterianas recombinantes de fusión que contenían diferentes fragmentos de la región extracelular de la desmogleína 1 (Allen y cols., 1993). Se observó que sólo un 30 a 40% de los sueros de pénfigo foliáceo reconocía una o varias de estas proteínas y que éstas no eran capaces de absorber los anticuerpos patógenos del suero de los enfermos. En la actualidad se sabe ya que en el pénfigo foliáceo los epítomos son principalmente conformacionales y calcio-dependientes. Por lo tanto era lógico que estas proteínas bacterianas recombinantes de fusión sólo expresasen una pequeña parte de los epítomos reconocidos por los anticuerpos de pacientes con pénfigo foliáceo. Más recientemente, se ha podido conseguir que un

tipo de células eucariotas (COS-1) expresen desmogleína 1 a nivel de su superficie (Emery y cols., 1995). De esta forma se ha podido estudiar mediante inmunofluorescencia indirecta la reactividad de distintos sueros de pénfigo foliáceo con estas células y, como era de esperar, todos los sueros de pénfigo foliáceo reconocieron la desmogleína 1 en su conformación nativa. Además, los anticuerpos que reconocían a la desmogleína 1 eran predominantemente de tipo IgG4 y su reactividad fue calcio-dependiente. Amagai y cols. han utilizado el sistema de expresión proteica del baculovirus para sintetizar desmogleína 1 recombinante soluble con preservación de los epítomos conformacionales (Amagai y cols., 1995b). De esta forma encontraron que esta proteína sintética reaccionaba con todos los sueros de pénfigo foliáceo. Además, la desmogleína 1 recombinante fue capaz de anular completamente la reactividad de los sueros por inmunofluorescencia indirecta si estos eran incubados previamente con ella. Finalmente, ratones inyectados con la IgG de sueros de pénfigo foliáceo que habían sido previamente incubados con esta proteína no mostraron la presencia de enfermedad. Así, la desmogleína 1 recombinante pudo absorber completamente los anticuerpos patógenos de estos sueros.

Como se comentaba en el apartado sobre pénfigo vulgar en un estudio reciente se utilizó desmogleína 1 y 3 recombinantes obtenidas mediante el sistema del baculovirus para desarrollar un método de ELISA para realizar el diagnóstico de pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo. En este estudio se pudo detectar anticuerpos contra la desmogleína 1 en el 96% de los sueros de pénfigo foliáceo analizados (Ishii y cols., 1997).

En conclusión, todos estos estudios apoyan la hipótesis que el suero de los pacientes con pénfigo foliáceo posee anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de la desmogleína 1. Estos son predominantemente de la subclase IgG4, son patógenos y probablemente responsables de la enfermedad cutánea de estos pacientes (Mascaró y Diaz, 1996).

2.2.3. Pénfigo Paraneoplásico

El pénfigo paraneoplásico es una enfermedad ampollosa recientemente descrita que se asocia a diversos tipos de neoplasia (Anhalt y cols., 1990; Mutasim y cols., 1993a). Las neoplasias que se han descrito más frecuentemente asociadas han sido hematológicas (linfomas no Hodgkin, leucemia linfática crónica, macroglobulinemia de Waldeström, tumor de Castleman), aunque también se han descrito timomas, sarcomas y carcinomas. Clínicamente se caracteriza por una afectación importante de las mucosas con erosiones dolorosas a nivel oral. Pueden haber también erosiones y ampollas genitales, así como conjuntivitis erosiva y afectación de otras mucosas como la nasal, orofaríngea, traqueobronquial y esofágica. No es sorprendente por ello que clínicamente se evoquen los diagnósticos de liquen plano erosivo, eritema polimorfo o síndrome de Stevens-Johnson. Las lesiones cutáneas suelen ser polimorfas, aunque es característica la presencia de una erupción de lesiones maculopapulosas eritematosas y ampollosas con múltiples erosiones. Estas lesiones pueden simular un pénfigo vulgar, eritema polimorfo, pénfigoide ampollosa o un liquen plano. Histológicamente las lesiones muestran ampollas intraepidérmicas y acantolisis suprabasal. Se ha descrito además la presencia de vacuolización de la basal y de queratinocitos necróticos en la epidermis (Horn y Anhalt, 1992).

Autoanticuerpos

La inmunofluorescencia directa de piel perilesional muestra la presencia de depósitos intercelulares epidérmicos de IgG y/o complemento. En algunos pacientes se pueden observar depósitos granulares o lineales a nivel de la unión dermoepidérmica. Al igual que en los otros tipos de pénfigo, el suero de los enfermos con pénfigo paraneoplásico contiene anticuerpos que

reaccionan con los espacios intercelulares de los epitelios planos estratificados. Así, la mayoría de los sueros de estos enfermos reaccionará con los espacios intercelulares del epitelio de esófago de mono y/o lengua de rata. Sin embargo, estos anticuerpos también son capaces de unirse a la superficie celular de epitelios simples, columnares y de transición, así como a otros tejidos no epiteliales (Mascaró y cols., 1996b). Se ha observado así unión a los espacios intercelulares del epitelio respiratorio, colon, intestino delgado, vejiga urinaria, tiroides, miocardio, músculo esquelético, e hígado. A menudo se ha empleado el epitelio transicional de la vejiga de rata como sustrato para realizar la inmunofluorescencia indirecta. Inicialmente se pensó que era una técnica muy específica (98.9%) para detectar los autoanticuerpos de los pacientes con pénfigo paraneoplásico y diferenciarlos de otros tipos de pénfigo (Liu y cols., 1993a). Sin embargo, en un estudio reciente, Helou y cols. han demostrado que este sustrato no es tan útil como inicialmente se pensaba ya que no permite detectar anticuerpos circulantes en todos los pacientes (Helou y cols., 1995). Dentro de un grupo de 28 pacientes, el 25% no mostró reactividad con el epitelio de vejiga de rata, mientras que los estudios de inmunoprecipitación confirmaron el diagnóstico de pénfigo paraneoplásico. También se ha visto que la especificidad de esta prueba no es tan elevada como se pensaba, ya que pueden existir falsos positivos, como en algunos pacientes con formas severas de eritema polimorfo (que pueden además confundirse clínicamente con un pénfigo paraneoplásico) que poseen anticuerpos circulantes contra las desmoplaquinas y que son positivos cuando se realiza la inmunofluorescencia indirecta del suero con vejiga de rata y otros tejidos (Foedinger y cols., 1995). En definitiva, la vejiga de rata es un sustrato con una especificidad (83%) y sensibilidad (75%) bastante altas que la hacen un buen sustrato para realizar el rastreo de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta de los sueros de pacientes con sospecha de

pénfigo paraneoplásico. No obstante un resultado negativo no descarta el diagnóstico, y la positividad tampoco lo confirma. Por ello, la inmunoprecipitación sigue siendo el método de elección para confirmar el diagnóstico de pénfigo paraneoplásico.

Autoantígenos

Anhalt y cols., en su descripción inicial y en otros estudios posteriores, han demostrado utilizando técnicas de inmunoprecipitación con extractos de queratinocitos marcados con isótopos radioactivos que el suero de los pacientes con pénfigo paraneoplásico reconoce un grupo de cinco polipéptidos de 250, 230, 210, 190, y 170-kDa (Anhalt y cols., 1990; Ousler y cols., 1992; Mascaró y cols., 1996b). Este patrón de inmunoprecipitación es único ya que estas proteínas no son reconocidas por ningún otro tipo de pénfigo. No todos los pacientes con pénfigo paraneoplásico reconocen todos estos polipéptidos; algunos tienen una escasa o nula reactividad con los antígenos de 250 y 230-kDa, mientras que la mayoría reacciona con las bandas proteicas de 210, 190 y 170-kDa. Recientemente se ha observado que los sueros de pénfigo paraneoplásico reaccionan con las bandas proteicas de 210 y 190-kDa utilizando técnicas de inmunoblot (Hashimoto y cols., 1995). Las bandas de 250 y 230-kDa fueron detectadas con menor frecuencia que con la inmunoprecipitación y la de 170-kDa no pudo detectarse utilizando esta técnica.

Se ha visto que las bandas de 250 y 210-kDa corresponden a la desmoplaquinas I y II, respectivamente (Stanley, 1995). Las desmoplaquinas son unas proteínas que forman parte de las placas citoplasmáticas de los desmosomas de las cuales son quizás el componente más importante. Como se ha mencionado antes, la presencia de anticuerpos contra las desmoplaquinas no es específica del pénfigo paraneoplásico ya que también se ha podido observar en algunos enfermos con eritema

polimorfo mayor (Foedinger y cols., 1995). Recientemente, sin embargo, se ha observado que la banda de 210-kDa no correspondería a la desmoplaquina II tal como se pensaba hasta ahora, sino que correspondería a una proteína que forma parte de las proteínas de la envoltura córnea de los queratinocitos denominada envoplaquina (Kim y cols., 1997). La banda de 230-kDa corresponde a BP230, el antígeno de 230-kDa del pénfigoide ampolloso. En el momento actual se desconoce cual es la identidad de las proteínas de 190 y 170-kDa. En la descripción original de la enfermedad se pensó que la banda proteica de 170-kDa correspondía a un producto de degradación de uno de los otros antígenos, sin embargo en la actualidad se cree que es un componente integral del complejo antigénico del pénfigo paraneoplásico ya que la mayoría de los sueros de pénfigo paraneoplásico la inmunoprecipita.

Patogenia

La patogenicidad de los anticuerpos de los pacientes con pénfigo paraneoplásico fue demostrada en la descripción original de la enfermedad utilizando el mismo modelo animal experimental que se había utilizado en los otros tipos de pénfigo (Anhalt y cols., 1990). La IgG purificada del suero de pacientes con pénfigo paraneoplásico fue inyectada intraperitonealmente a ratones recién nacidos y estos presentaron vesículas intraepidérmicas, así como depósitos de IgG humana a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis. Dado que tanto las desmoplaquinas como el antígeno de 230-kDa son proteínas intracelulares no se cree que los autoanticuerpos dirigidos contra estas proteínas puedan ser patógenos (Stanley, 1995). Se ha demostrado además que los anticuerpos anti-desmoplaquina que presentan algunos enfermos con eritema polimorfo no son patógenos (Foedinger y cols., 1995). Es por ello, que se ha hipotetizado que quizás sean los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de 190-kDa ó el de 170-

kDa los que puedan ser responsables de la enfermedad (Stanley, 1995) dado que tanto las desmoplaquinas como BP230 son proteínas intracelulares y por lo tanto los anticuerpos no serían capaces de unirse a ellas si las células están intactas.

3. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ACANTOLISIS EN EL PÉNFIGO VULGAR

A pesar de los grandes avances realizados en el conocimiento de los anticuerpos y antígenos implicados en el pénfigo vulgar no está claro aún cual es el mecanismo por el cual los autoanticuerpos son capaces de inducir la acantolisis en la epidermis. Tal como se ha comentado previamente, la mayoría de los estudios actuales se hallan encaminados a identificar los diferentes epítomos contra los cuales van dirigidos los anticuerpos de los pacientes, y más concretamente los epítomos patógenos, es decir aquellos epítomos contra los cuales van dirigidos aquellos anticuerpos capaces de desencadenar las lesiones cutáneas. Sin embargo, es de gran interés tanto a nivel teórico como práctico, saber lo que sucede en la epidermis a partir del momento que las moléculas de IgG se unen al antígeno diana en la superficie de los queratinocitos. Se ha observado, por ejemplo, que cuando se realizan estudios cronológicos utilizando el modelo animal de transferencia pasiva el hallazgo más precoz, que aparece en las tres primeras horas después de la inyección de anticuerpos, es un ensanchamiento de los espacios intercelulares correspondiente a un edema intercelular a ese nivel (Takahashi y cols., 1985; Anhalt y Diaz, 1989). Se aprecia además una rotura de la adhesión de los tonofilamentos a la placa desmosómica, produciéndose una retracción de los mismos alrededor del núcleo. Estos hallazgos se van intensifican posteriormente y se observa finalmente la separación de las células.

Repasaremos a continuación los distintos mecanismos patogénicos que se han implicado en el desarrollo de las lesiones cutáneas en el pénfigo: papel del complemento, valencia de los anticuerpos, pérdida de función de la desmogleína 3, papel de las proteasas, y activación de señales de

transducción intracelular.

3.1 Papel del Complemento

Los primeros estudios de inmunofluorescencia directa permitieron evidenciar la presencia de depósitos de la fracción C3 del complemento a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis de la piel perilesional de pacientes afectados de pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo. Posteriormente se demostró que en ratones recién nacidos inyectados con la fracción IgG de estos pacientes también se reproducían estos mismos depósitos de C3. Estos hallazgos apoyaban sin duda la hipótesis de que la activación del sistema del complemento jugaba un papel importante dentro de la patogenia de estas dos enfermedades, y durante unos años se pensó que esta activación era la responsable de la acantolisis.

Sin embargo, los estudios experimentales han demostrado que esto no es cierto. La inyección de IgG de pénfigo vulgar es capaz de causar enfermedad tanto en ratones con un déficit genético del complemento como en ratones en los cuales el complemento ha sido inactivado mediante la administración de veneno de cobra (Anhalt y cols., 1986a). Estos resultados sugieren que la activación de la cascada del complemento no es necesaria para la aparición de las lesiones ampollosas en el pénfigo vulgar.

En el caso del pénfigo foliáceo se demostró inicialmente que las fracciones $F(ab')_2$ y Fab' de la IgG del suero de pacientes con pénfigo foliáceo también eran patógenas utilizando el modelo murino experimental (Rock y cols., 1989). Dado que los fragmentos $F(ab')_2$ y Fab' no son capaces de activar el sistema del complemento estos hallazgos también sugieren que la activación de la cascada del complemento no es necesaria para la aparición de las lesiones ampollosas en el pénfigo foliáceo. Estos hallazgos han sido recientemente ampliados mediante la demostración que

la IgG de pénfigo foliáceo es capaz de inducir enfermedad cuando se inyecta a ratones con un déficit genético del complemento o bien ratones en los cuales se ha inactivado el sistema del complemento mediante la administración de veneno de cobra (España y cols., 1997). En conclusión, todos estos hallazgos sugieren que tanto en el pénfigo vulgar como en el pénfigo foliáceo los autoanticuerpos pueden provocar la acantolisis sin precisar de la activación del sistema del complemento para que aparezcan las lesiones cutáneas.

3.2. Valencia de los Anticuerpos

El papel de la valencia de los anticuerpos se ha estudiado en algunas enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos (Peers y cols., 1993; Drachman, 1994). El caso más ilustrativo es el de la miastenia grave, una enfermedad neurológica autoinmune en la cual los anticuerpos provocan la desaparición de los receptores de acetilcolina de la membrana postsináptica de la placa motora (Drachman, 1994). Esta enfermedad se caracteriza por la existencia de una debilidad muscular tras actividad prolongada que tiende a recuperarse tras un periodo de descanso o con la administración de fármacos anticolinérgicos. Se ha demostrado que la debilidad muscular de los pacientes afectados de miastenia grave está relacionada con la presencia en el suero de los pacientes de anticuerpos circulantes frente a los receptores de acetilcolina. Además, se ha demostrado que la transferencia pasiva de la IgG de los pacientes a ratones es capaz de reproducir gran parte de las características de la enfermedad en estos animales (Toyka y cols., 1977). Posteriormente se ha visto que la capacidad que tiene la IgG de los pacientes de producir patología en animales de experimentación depende de su valencia. Así, si se inyectan animales con fragmentos Fab monovalentes obtenidos de la IgG de

pacientes con miastenia grave éstos no desarrollan enfermedad (Drachman y cols., 1978). Al utilizar los fragmentos Fab monovalentes estos siguen siendo capaces de unirse a los receptores de acetilcolina pero no de acelerar su degradación como hacen los anticuerpos bivalentes, y por lo tanto no producen enfermedad tras ser inyectados en animales. Para explicar este fenómeno se ha hipotetizado que es el entrecruzamiento (*cross-linking*) a nivel de la superficie celular del receptor de la acetilcolina, antígeno de la enfermedad, por anticuerpos bivalentes lo que desencadenaría la activación de sistemas intracelulares, con la consiguiente internalización rápida de los receptores de acetilcolina por un proceso de endocitosis y su posterior degradación (Drachman y cols., 1978; Drachman, 1994). Por lo tanto, en el caso de la miastenia grave se cree que es la capacidad de una molécula de anticuerpo de unirse a dos moléculas de antígeno en la superficie celular lo que desencadena la enfermedad.

Tal como se ha comentado previamente, el papel patogénico de los anticuerpos del pénfigo vulgar ha sido demostrado utilizando experimentos de transferencia pasiva a ratones recién nacidos. En éstos la inyección de la fracción IgG obtenida del suero de pacientes con pénfigo vulgar fue capaz de reproducir todas las características de la enfermedad humana cuando fue inyectada intraperitonealmente a estos animales (Anhalt y cols., 1982). Posteriormente se estudió el papel de la valencia de los autoanticuerpos en la inducción de la acantolisis utilizando el mismo modelo experimental (Anhalt y cols., 1986). Los fragmentos $F(ab')_2$ y Fab' obtenidos de la fracción IgG de un sólo paciente con pénfigo vulgar fueron inyectados intraperitonealmente a ratones recién nacidos. Los siete animales inyectados con fragmentos $F(ab')_2$ presentaron ampollas y erosiones cutáneas mientras que ninguno de los cinco animales inyectados con los fragmentos Fab' desarrolló lesiones cutáneas. A pesar de ello por inmunofluorescencia directa se pudo observar que estos fragmentos se

unían a los espacios intercelulares de la epidermis de estos animales. Se concluyó por lo tanto que los fragmentos monovalentes de los anticuerpos de pénfigo vulgar no eran patógenos en el ratón a pesar de que se mantuviese su capacidad para unirse a la epidermis. Estos hallazgos contrastan notablemente con lo que se halló posteriormente en el caso del pénfigo foliáceo, en el que tanto los fragmentos $F(ab')_2$ como Fab' de la fracción IgG del suero de un paciente con pénfigo foliáceo endémico fueron capaces de inducir enfermedad tras ser inyectados por vía subcutánea a ratones recién nacidos (Rock y cols., 1990).

Todo ello sugeriría que en el caso del pénfigo vulgar, al igual que en la miastenia grave y paradójicamente al contrario que sucede en el pénfigo foliáceo, es necesaria la unión de dos fragmentos Fab al antígeno diana para que aparezca la acantolisis. Esto daría lugar a un entrecruzamiento (*cross-linking*) de la desmogleína 3 en la superficie celular, lo que a su vez activaría señales de transducción intracelular que bien directamente, bien a través de una activación de las proteasas o de una pérdida de función de la desmogleína darían lugar a la formación de ampollas en el interior de la epidermis.

3.3. Pérdida de Función de la Desmogleína 3

Otro de los mecanismos que se ha sugerido para explicar la acantolisis es una pérdida de función de la desmogleína 3. Aquí se ha hipotetizado que la acantolisis sería desencadenada por la simple unión de los anticuerpos de pénfigo vulgar a alguna zona de la desmogleína 3 que medie su adhesividad con la célula vecina, dando lugar a una pérdida de su función adhesiva (Díaz y Marcelo, 1978). A pesar de que hasta la fecha no han habido trabajos que demuestren esta hipótesis, se han publicado recientemente los resultados de un estudio con ratones transgénicos que refuerza el papel de

la pérdida de función de la desmogleína 3 en la patogenia del pénfigo vulgar (Koch y cols., 1997). En dicho estudio se logró producir ratones con una mutación selectiva a nivel del gen de la desmogleína 3. Se confirmó la mutación en los animales homocigotos mediante la demostración que estos ratones no poseían ARN mensajero de la desmogleína 3 y que dicha proteína no podía demostrarse en la piel mediante inmunofluorescencia o inmunoblot. Los ratones homocigotos para esta mutación eran normales al nacer pero a los pocos días comenzaron a perder peso. Se objetivó que esto era debido a un problema en la ingesta ocasionado por la existencia de erosiones orofaríngeas que histológicamente mostraban una acantolisis suprabasal como la que se observa en las biopsias de pénfigo vulgar. La microscopía electrónica objetivó una separación de los desmosomas. Los animales presentaban además caída del pelo, costras, y ampollas suprabasales a nivel de la piel. Estos resultados demuestran la importancia de la desmogleína 3 en la adhesión celular a nivel de las capas más profundas de queratinocitos epidérmicos y sugieren además que los anticuerpos en el pénfigo podrían actuar interfiriendo directamente la función adhesiva de esta proteína (Koch y cols., 1997).

3.4. Proteasas

La plasmina es una enzima de la familia de las proteasas que posee un amplio espectro y que es capaz de digerir estructuras de unión como los desmosomas. Esta enzima circula en el suero en forma de un precursor inactivo, el plasminógeno, que precisa de la acción del activador del plasminógeno. El activador del plasminógeno a su vez es otra enzima que activa el plasminógeno sérico y lo transforma en plasmina. Esto suele ocurrir principalmente a nivel de la superficie celular dado que el activador del plasminógeno se mantiene activo unido a unos receptores que se hallan

localizados a nivel de la superficie de las células, impidiendo su inactivación por parte de inhibidores séricos.

El aumento de actividad de las proteasas (concretamente la plasmina) a nivel de las lesiones ha sido implicado como mecanismo desencadenante de la acantolisis. Esto fue inicialmente sugerido por un estudio en el que se observó que al cabo de 6-8 horas de añadir IgG de pénfigo vulgar a cultivos de queratinocitos aparecía un aumento del activador del plasminógeno y posteriormente acantolisis (Hashimoto y cols., 1983). Del mismo modo, en otro estudio similar se demostró que si se añadía IgG del suero de pacientes con pénfigo foliáceo aparecía acantolisis y un aumento de síntesis del activador del plasminógeno (Morioka y cols., 1987). En un estudio reciente se ha observado que la IgG de sueros de pénfigo vulgar aumenta significativamente la expresión del receptor del activador del plasminógeno en la superficie de células DJM-1 y de queratinocitos normales en cultivos tras 3 y 7 días de incubación (Seishima y cols., 1997).

Se ha hipotetizado que la unión de la IgG de sueros de pénfigo vulgar activaría los mecanismos de transducción intracelular con un aumento consecuente de la expresión del receptor del activador del plasminógeno y de la actividad del activador del plasminógeno en la superficie celular. Esto daría lugar a una activación selectiva de la plasmina en la superficie de las células con la consiguiente digestión enzimática de las proteínas desmosómicas y acantolisis.

Sin embargo, utilizando el modelo animal experimental se ha observado que si se inyecta primero dexametasona (un inhibidor del activador del plasminógeno) a los ratones, éstos continúan desarrollando enfermedad tras inyectar IgG de pénfigo vulgar (Anhalt y cols., 1986b). Además, en estudios recientes hemos observado que la inyección de la fracción IgG de sueros de pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo a ratones con un

déficit genético del activador del plasminógeno (ratones *knock-out*), éstos presentan lesiones ampollosas típicas de la enfermedad idénticas a las de ratones sanos (Liu y Mascaró, observaciones no publicadas). Todas estas observaciones van en contra de que las proteasas, en particular el sistema del plasminógeno, jueguen un papel determinante en la acantolisis inducida por los autoanticuerpos en el pénfigo vulgar.

3.5. Activación de Señales de Transducción Intracelular

Las señales de transducción intracelular aparecen tras la unión de una molécula extracelular (que se denomina primer mensajero) a un receptor en la membrana celular. Esto desencadena la producción de una sustancia intracelular (que se denomina segundo mensajero) que es la que mediará los efectos celulares del primer mensajero. Uno de los segundos mensajeros de mayor importancia es el inositol trifosfato que se produce a consecuencia de la activación de dos receptores: unos ligados a la proteína G (GTP dependientes) y otros ligados a la tirosín quinasa (ATP dependientes). Al ser activados en la superficie celular estos receptores actúan sobre el fosfoinositol difosfato presente en la membrana plasmática y a través de la fosfolipasa C producen un aumento de la concentración intracelular de inositol trifosfato y de calcio por una parte, y una elevación de diacilglicerol junto a una estimulación de la proteínquinasa C por otra. Esta enzima tiene la capacidad de fosforilar algunas proteínas intracelulares y de esta manera podría controlar diferentes procesos celulares.

Se ha observado en los últimos años que la unión de los anticuerpos de pénfigo vulgar con el antígeno en la superficie de los queratinocitos es capaz de activar señales de transducción intracelular (Kitajima, 1996). En dos estudios recientes se han observado hallazgos que sugieren que las vías metabólicas del calcio y del inositol están implicadas en la acantolisis.

En primer lugar, se observó que al añadir la fracción IgG de sueros de pénfigo foliáceo y pénfigo vulgar a queratinocitos en cultivo se producía un aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular (Seishima y cols., 1995). Se vio también que este fenómeno venía precedido por un rápido aumento del inositol trifosfato, sugiriendo que el inositol trifosfato es el mediador del aumento de calcio intracelular provocado por la IgG de pénfigo. Posteriormente, este mismo grupo de trabajo observó que estas respuestas eran abolidas por un inhibidor de la fosfolipasa C a pesar de persistir la unión del anticuerpo IgG a la superficie celular. Se cree por lo tanto que la fosfolipasa C estaría implicada y sería la responsable del paso de inositol difosfato a trifosfato (Esaki y cols., 1995). Estos dos estudios han puesto de manifiesto que la vía metabólica del inositol puede jugar un papel en la acantolisis inducida por la IgG del pénfigo foliáceo y del pénfigo vulgar (Esaki y cols., 1995).

Como se ha mencionado antes la fosfolipasa C también produce diacilglicerol, otro segundo mensajero capaz de activar a la proteínquinasa C. Por dicho motivo también se ha estudiado el papel de esta enzima y recientemente se ha observado que después de añadir IgG de pénfigo a queratinocitos en cultivo existe un rápido aumento de actividad de las diferentes isoenzimas de la proteínquinasa C durante al menos los primeros 30 minutos (Osada y cols., 1997). La observación de estas alteraciones únicamente con la IgG de pacientes con pénfigo foliáceo y pénfigo vulgar, pero no con la de controles sanos o de pacientes con penfigoide ampolloso, indicaría que la IgG de pénfigo da lugar a un patrón de transducción de señales intracelulares característico con activación de la fosfolipasa C, movilización del calcio intracelular dependiente del inositol trifosfato y activación de la proteínquinasa C. Todos estos mecanismos se hallan resumidos en la **FIGURA 7**.

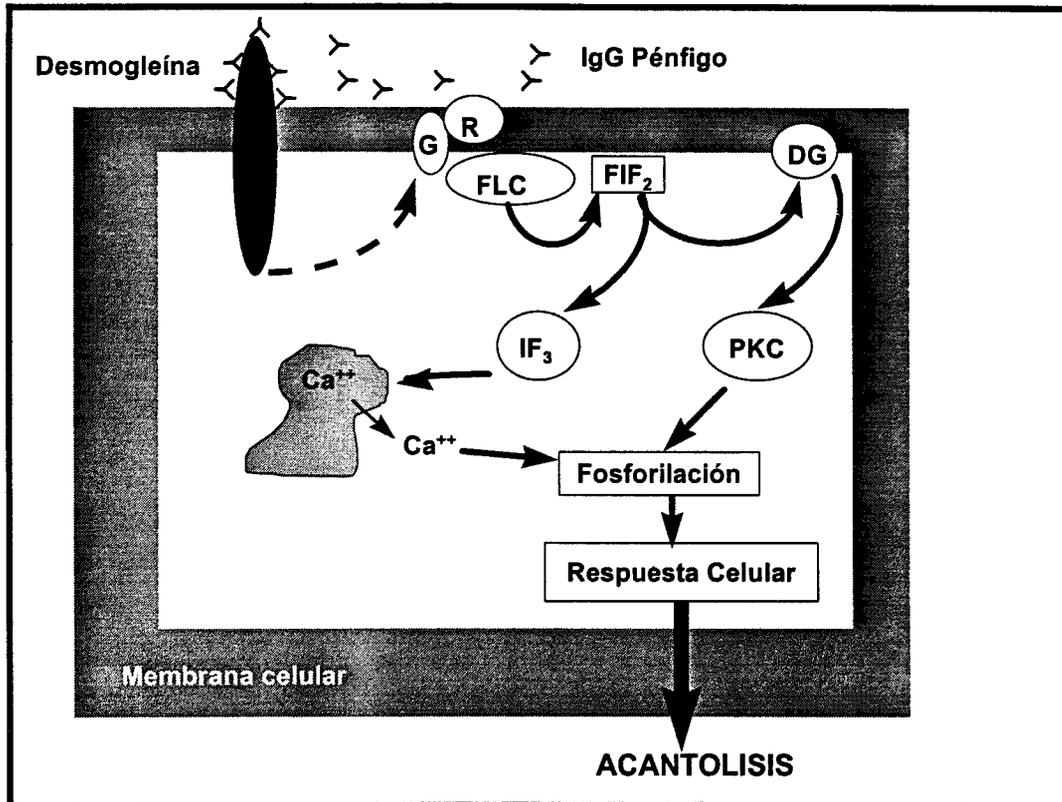


FIGURA 7. Diagrama esquemático de los mecanismos intracelulares que podrían estar implicados en la acantolisis tras la unión de la IgG de pénfigo al antígeno a nivel de la superficie celular. FLC, fosfolipasa C; IF₃, inositol trifosfato; FIF₂, fosfatidil difosfato; DG, diacilglicerol; PKC, proteínquinasa C; G, proteína G; R, receptores; Ca⁺⁺, calcio. Diagrama adaptado de Kitajima (Kitajima, 1996).

Se piensa así que tras unirse los autoanticuerpos de los pacientes con pénfigo al antígeno diana (desmogleína) en la superficie celular se activarían algunos receptores de membrana, con posterior activación de la fosfolipasa C y estimulación de la vía del inositol. Esta estimulación conllevaría entonces un aumento del calcio intracelular y una estimulación de la proteínquinasa C. Ello podría dar lugar a la fosforilación de proteínas

constitutivas importantes de la placa desmosómica a nivel de serina/treonina o tirosina, con la consiguiente pérdida de la funcionalidad adhesiva. Además, la activación de la proteínquinasa C produciría una fosforilación en residuos serina de otras proteínas, entre las que se incluirían las desmogleínas y las desmoplaquinas, lo que produciría una pérdida de la unión entre éstas y los filamentos intermedios. El aumento del calcio intracelular por otra parte podría también actuar sobre otras proteínas constitutivas de la placa desmosómica u otras uniones como las que facilitan la interacción entre los filamentos de actina y la membrana plasmática (Tanaka y cols., 1991b).

Todos los mecanismos revisados aquí no se excluyen entre ellos. Así, la unión de autoanticuerpos bivalentes de sueros de pénfigo vulgar daría lugar a un entrecruzamiento (*cross-linking*) de la desmogleína 3 en la superficie celular, lo que a su vez activaría los mecanismos de transducción intracelular. Dicha activación podría producir una pérdida de la función adhesiva de la desmogleína 3 y/o un aumento de la expresión del receptor del activador del plasminógeno y de la actividad del activador del plasminógeno en la superficie celular con la posterior activación de la plasmina. El sistema del complemento, finalmente, aunque no sea necesario para desencadenar la acantolisis podría jugar un papel importante en la amplificación de todos estos mecanismos que darán lugar a la formación de ampollas en el interior de la epidermis.

OBJETIVOS

En este trabajo se ha pretendido investigar el mecanismo molecular por el cual se produce la acantolisis en el pénfigo vulgar desde el punto de vista de la valencia de los autoanticuerpos. Por ello en este estudio se ha evaluado si los fragmentos monovalentes (Fab) de los anticuerpos de pénfigo vulgar son capaces de inducir enfermedad como en el caso en el pénfigo foliáceo. Para ello se ha comparado la capacidad de inducción de acantolisis de fragmentos bivalentes [IgG y F(ab')₂] y monovalentes [Fab] de anticuerpos de pénfigo vulgar. El poder investigar si los autoanticuerpos de pénfigo vulgar difieren realmente de los de pénfigo foliáceo en el modo en que producen la acantolisis (unión simple de los anticuerpos al antígeno vs entrecruzamiento) nos puede proporcionar una nueva visión sobre los mecanismos por los cuales estos autoanticuerpos son capaces de desencadenar acantolisis.

Así, los objetivos concretos de la presente Tesis han sido los siguientes:

- **Estudiar el papel patogénico de los fragmentos F(ab')₂ de la IgG del suero de pacientes con pénfigo vulgar utilizando un modelo animal experimental.**
- **Estudiar el papel patogénico de los fragmentos Fab de la IgG del suero de pacientes con pénfigo vulgar utilizando un modelo animal experimental.**

- **Estudiar el curso evolutivo de la acción patogénica de la IgG del suero de pacientes con pénfigo vulgar utilizando un modelo animal experimental.**
- **Estudiar el curso evolutivo de la acción patogénica, si la hubiese, de la Fab del suero de pacientes con pénfigo vulgar utilizando un modelo animal experimental. Compararlo con el de la IgG.**
- **Estudiar y comparar el papel patogénico de dosis equimolares de las fracciones IgG y Fab de pénfigo vulgar de un mismo paciente utilizando un modelo animal experimental.**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para realizar los experimentos de transferencia pasiva de anticuerpos se emplearon ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Los animales tenían entre 24 y 48 horas de vida y su peso oscilaba entre 1.3 y 2 gramos. Los ratones se obtuvieron de una colonia de progenitores mantenida en el Animal Resource Center del Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Estados Unidos.

2. SUEROS HUMANOS EMPLEADOS

Para los experimentos de transferencia pasiva se utilizó el suero de 3 pacientes con pénfigo vulgar. En cada uno de los pacientes el diagnóstico se había realizado en base a criterios clínicos, histológicos e inmunopatológicos. Cada uno de los sueros había sido obtenido por plasmaféresis por el Dr. Luis A. Diaz durante su estancia en los Departamentos de Dermatología de la Universidad de Michigan en Ann Arbor (Michigan, Estados Unidos) y en la Universidad John Hopkins de Baltimore (Maryland, Estados Unidos). Los sueros de estos pacientes y las distintas fracciones obtenidas de ellos serán denominados de aquí en adelante como RL, EK y VDV de acuerdo con las iniciales de cada paciente. Como control negativo para los diferentes experimentos se utilizó el suero de dos voluntarios sanos.

3. PRODUCCIÓN DE DESMOGLEÍNA 3 RECOMBINANTE UTILIZANDO EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL BACULOVIRUS

La región extracelular de la desmogleína 3 que se empleó para caracterizar los sueros mediante inmunoblot e inmunoprecipitación fue preparada utilizando el sistema de expresión proteica del baculovirus siguiendo una técnica ya descrita (Amagai y cols., 1994b). Para ello se clonó primero en un vector pCRII el ADN complementario intacto de la región extracelular de la desmogleína 3 y éste fue secuenciado de forma que se verificó que la secuencia fuese idéntica a la que ha sido publicada para la desmogleína 3 (Amagai y cols., 1991). Este ADN complementario se expresó entonces en el sistema de expresión del baculovirus (MAXBAC BEVS, Invitrogen, San Diego, California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Así, el ADN complementario fue subclonado primero en un vector de expresión de baculovirus (PVL1393) y se transfectaron entonces con él células de insecto de tipo Sf9. El baculovirus recombinante fue entonces aislado y se confirmó mediante PCR que el ADN complementario tenía una inserción correcta. Se preparó entonces un *stock* de baculovirus recombinante con un elevado número de copias del ADN complementario de la región extracelular de la desmogleína 3. Posteriormente se infectaron células de insecto de tipo Hi-5 con el *stock* de virus recombinante y estas fueron cultivadas durante 4 días. Las células secretaron entonces la proteína recombinante (región extracelular de la desmogleína 3) al medio de cultivo celular a partir de donde se pudo obtener mediante recolección del sobrenadante tras centrifugarlo para eliminar detritos celulares.

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS

4.1. Inmunofluorescencia

Los sueros de los tres pacientes y de los dos voluntarios sanos fueron estudiados por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales de cabra dirigidos contra la fracción Fc de la IgG humana marcados con isotiocianato de fluoresceína (Cappel, Durham, North Carolina, Estados Unidos). Se utilizó esófago de mono como substrato para la inmunofluorescencia indirecta y se siguieron métodos rutinarios ya descritos (Emery y cols., 1995).

Se realizó además un estudio de subclases de los autoanticuerpos en los 3 pacientes con pénfigo mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra cada una de las 4 subclases de la IgG humana como anticuerpos secundarios. Como anticuerpo terciario se empleó un anticuerpo policlonal de oveja dirigido contra la IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína siguiendo métodos ya descritos (Rock y cols., 1989).

4.2. Inmunoblot

Los sueros fueron estudiados mediante inmunoblot utilizando métodos ya descritos (Giudice y cols., 1993). Como substrato se emplearon extractos de epidermis humana obtenidos a partir de piel de prepucio procedente de circuncisiones de recién nacidos (la circuncisión se practica de forma rutinaria a todos los recién nacidos varones en Estados Unidos, y por ello esta es la forma más sencilla de obtener piel sana). La epidermis fue separada de la dermis calentando la piel a 56°C durante 30 segundos.

Posteriormente se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido, se homogeneizó con un mortero y después se solubilizó en una solución tampón con SDS al 2%. Tras mezclarla bien se realizó la ultrasonicación de la muestra en 4 ciclos de 15 segundos a 4°C. Después la muestra se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 20 minutos y, tras descartar el precipitado, el sobrenadante fue calentado a 100°C durante 2 minutos. Se realizó entonces la separación de las proteínas del extracto epidérmico mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 6% utilizando condiciones reductoras de acuerdo con el procedimiento descrito originalmente por Laemmli (Laemmli, 1970). Para poder estimar el peso molecular de las proteínas y de las bandas proteicas inmunorreactivas se utilizaron marcadores de peso molecular estandarizados (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos).

Las proteínas epidérmicas fueron transferidas después a un papel de nitrocelulosa mediante la aplicación de una corriente de 40 voltios durante toda la noche a 4°C (Towbin y cols., 1979). Posteriormente se cortó el papel de nitrocelulosa en tiras que fueron incubadas en una solución tampón bloqueadora de PTX (10 mM NaPO₄, Tritón X-100 al 0.2%, 0.15 M NaCl, 1 mM EGTA, 0.006% azida sódica, pH 7.5) con albúmina sérica bovina al 4% durante 45 minutos. Seguidamente las tiras de papel se incubaron con los diferentes sueros diluidos al 1 por 100 en solución bloqueadora a temperatura ambiente durante toda la noche (unas 16 horas). Las tiras se lavaron entonces 5 veces durante 5 minutos con una solución tampón de lavado (0.05% Tritón X-100, 5 mM Trietanolamina pH 7.4, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA pH 7.4, 0.01% SDS) y justo después se realizó un nuevo bloqueo con la solución tampón bloqueadora durante 45 minutos. Para poder detectar los anticuerpos unidos a las tiras se realizó a continuación una incubación de éstas con proteína A de *Staphilococcus Aureus* (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) marcada con I¹²⁵ (2 x 10⁶ c.p.m./ml) a una

dilución de 1:10.000 durante 1 hora (Calvanico y cols., 1991). Se realizaron después 5 lavados de 5 minutos con la solución tampón de lavado. Se detectó finalmente la proteína A marcada unida a las tiras de nitrocelulosa exponiendo el blot a una película de rayos X durante unas 20 horas a -70°C . Se utilizaron sueros humanos de individuos sanos y sueros de pacientes con pénfigo vulgar de conocida reactividad con la desmogleína 3 por inmunoblot como controles negativos y positivos respectivamente.

También se realizó el estudio de los sueros por inmunoblot utilizando como substrato la proteína recombinante con la secuencia de la región extracelular de la desmogleína 3 producida gracias al sistema del baculovirus. Para este estudio la técnica del inmunoblot se realizó del mismo modo que se ha indicado con la salvedad de que la electroforesis se realizó con un gel de SDS-poliacrilamida al 10% dado que esta proteína tiene un peso molecular inferior al de la desmogleína 3 intacta (alrededor de 66-kDa por 130-kDa de la molécula intacta).

4.3. Inmunoprecipitación

La presencia de autoanticuerpos contra la desmogleína 3 se investigó también mediante técnicas de inmunoprecipitación. Para ello se utilizó la proteína recombinante con la secuencia de la región extracelular de la desmogleína 3 producida gracias al sistema del baculovirus. Tras ser sintetizada dicha proteína fue radiomarcada con I^{125} utilizando el método de la Cloramina T.

Para realizar la inmunoprecipitación se utilizaron 60 μl de proteína recombinante radiomarcada y se mezclaron con 10 μl de cada suero. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente se añadieron 50 μl de una solución al 10% de *Staphilococcus Aureus* fijados en solución tampón de inmunoprecipitación (TBS, pH 7.6; 5mM CaCl_2 ; 1% Tritón X-100; 1%

albúmina sérica bovina) y se realizó una nueva incubación de 1 hora. Después se centrifugó todas las muestras y los precipitados se lavaron con la misma solución tampón pero esta vez sin que contuviese albúmina sérica bovina. Se extrajeron entonces de los precipitados los inmunocomplejos unidos a *S. Aureus* utilizando una solución de glicina/HCl 0.2M, pH 2.8 conteniendo EDTA 5mM. Se añadió luego SDS a las muestras hasta conseguir una concentración final del 0.1%. Los precipitados se disolvieron con SDS al 0.1% en TBS sin calcio y se separaron los inmunocomplejos mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Se realizó finalmente la detección de los inmunocomplejos exponiendo el gel a una película de rayos X durante unas 20 horas a -70°C.

La presencia de autoanticuerpos contra la desmogleína 1 se investigó mediante técnicas de inmunoprecipitación utilizando un procedimiento descrito originalmente por Labib en el que se emplean fragmentos proteolíticos de epidermis bovina como fuente de desmogleína 1 (Labib y cols., 1990). Mediante un queratomo se obtuvo la epidermis de hocicos de vaca procedentes de un matadero. Tras lavar y cortar la epidermis en pequeños fragmentos estos fueron incubados en una solución de tripsina y se realizó la digestión a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó la muestra y el sobrenadante fue incubado a temperatura ambiente con PMSF 1 mM para inactivar la tripsina. Después, el sobrenadante se vertió en una columna de agarosa-concavalina A, y posteriormente las glicoproteínas que se habían unido a la columna se eluyeron utilizando α -metilmanosida, y fueron concentradas mediante ultrafiltración. Finalmente las glicoproteínas fueron radiomarcadas con 125 I siguiendo el procedimiento de la Cloramina T y se utilizaron entonces para realizar la inmunoprecipitación. Se utilizó la misma técnica descrita en el párrafo anterior con la salvedad de que la electroforesis se realizó con un gel de SDS-poliacrilamida al 12% dado que las 2 bandas inmunorreactivas correspondientes a los fragmentos de la

desmogleína 1 bovina que habitualmente reconocen los sueros con anticuerpos contra la desmogleína 1 tienen 66 y 45 -kDa respectivamente (Labib y cols., 1990).

5. PREPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES INYECTADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA

5.1. Purificación de la IgG a partir del suero

La fracción IgG del suero de los 3 pacientes y de los dos sueros normales se obtuvo mediante la precipitación del suero con sulfato amónico al 50% seguida de una cromatografía en gel. El procedimiento consistió en añadir muy lentamente (gota a gota) el mismo volumen de una solución saturada de sulfato amónico a cada uno de los sueros empleados. Esto provocó la precipitación de las proteínas de mayor peso molecular y entonces las muestras fueron centrifugadas a 15.000 r.p.m. durante unos 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue entonces redisolto en PBS y dializado durante 24 a 48 horas a 4°C contra una solución de PBS que se renovó en 3 ocasiones. Tras la diálisis las muestras fueron centrifugadas y se descartó el precipitado. Se realizó entonces una separación cromatográfica de las proteínas del sobrenadante en base a su peso molecular (Determann, 1968). Para ello dicho sobrenadante fue vertido en una columna de 110 x 2.5 cm de Sephadex G-200 (Pharmacia Biotech, Washington, Distrito de Columbia, Estados Unidos) equilibrada con PBS a pH 7.2. Se monitorizó la eliminación de las distintas fracciones mediante espectrofotometría y se separó las fracciones correspondientes a la IgG. Esto último se verificó mediante la realización de doble inmunodifusión en

gel (Ouchterlony) utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra la fracción Fc de la IgG humana. Las diferentes fracciones correspondientes a la IgG se juntaron y fueron concentradas por ultrafiltración (Amicon, Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts, Estados Unidos). Las fracciones destinadas a experimentos de transferencia pasiva fueron entonces esterilizadas utilizando filtros Millipore de 0.22 μm .

5.2. Preparación de los fragmentos F(ab')₂

Los fragmentos F(ab')₂ de cada una de las fracciones de IgG purificada de los sueros de pacientes e individuos sanos se obtuvieron mediante digestión enzimática con pepsina (Stanworth y Turner, 1973). Para ello se dializó primero la IgG durante toda la noche a 4°C contra una solución de tampón acetato 0.1 M con un pH de 4.5. Se realizó posteriormente la digestión con pepsina (Sigma) durante 6 horas a 37°C. La digestión enzimática se detuvo añadiendo Tris-Base para aumentar el pH hasta 8 y así inactivar la pepsina. Se dializó la muestra toda la noche a 4°C contra PBS y se realizó después una cromatografía de afinidad para retirar aquellas moléculas de IgG que no hubiesen sido digeridas por la pepsina. Se utilizó para ello una columna con esferas de sefarosa unidas a proteína G de *Staphilococcus Aureus* (Pharmacia Biotech). La fracción F(ab')₂ fue entonces concentrada por ultrafiltración y esterilizada con filtros Millipore. Las distintas fracciones de F(ab')₂ preparadas de este modo fueron examinadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida utilizando condiciones no reductoras mostrando siempre una banda única de 110-kDa sin contaminación por IgG. En el caso de las fracciones F(ab')₂ de los pacientes con pénfigo vulgar se practicó también una inmunofluorescencia indirecta. Estas fracciones fueron siempre positivas (presencia de anticuerpos contra los espacios intercelulares) cuando se empleó un anticuerpo policlonal de cabra anti-

F(ab')₂ humana marcado con fluoresceína (Cappel) como anticuerpo secundario mientras que fueron siempre negativas cuando se empleaba un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humana marcado con fluoresceína (Cappel) como anticuerpo secundario.

5.3. Preparación de los fragmentos Fab

Los fragmentos Fab de cada una de las fracciones de IgG purificada de los sueros de pacientes e individuos sanos se obtuvieron mediante digestión enzimática con papaína (Mage, 1980). La digestión de las fracciones purificadas de IgG con papaína (Sigma) se realizó durante 16 horas a 37°C en una solución tampón de PBS con 0.02M EDTA y 0.02M cisteína. La digestión enzimática se detuvo añadiendo yodoacetamida hasta llegar a una concentración de 0.03 M. Se dializó entonces las muestras toda la noche a 4°C contra PBS y se realizó después una cromatografía de afinidad con una columna de sefarosa-proteína G de *S. Aureus* como en el caso anterior. La fracción Fab fue entonces concentrada por ultrafiltración y esterilizada con filtros Millipore. Las fracciones de Fab preparadas de este modo fueron también examinadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida utilizando condiciones no reductoras. Dichas fracciones mostraron siempre una banda única de 50-kDa, sin contaminación por IgG. En el caso de las fracciones Fab de los pacientes con pénfigo vulgar, la inmunofluorescencia indirecta fue positiva cuando se empleaban anticuerpos policlonales de cabra anti-F(ab')₂ humana marcados con fluoresceína, y fue siempre negativa cuando se emplearon anticuerpos policlonales de cabra anti-Fc humana marcados con fluoresceína.

6. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA A ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

6.1. Evaluación de la patogenicidad de las fracciones IgG, F(ab')₂ y Fab de los sueros de pacientes con pénfigo vulgar

Para los experimentos de transferencia pasiva se inyectaron ratones recién nacidos de tipo BALB/c con las fracciones IgG, F(ab')₂ o Fab que se habían preparado a partir de los sueros de los tres pacientes con pénfigo vulgar y de los dos voluntarios sanos. Las inyecciones se realizaron siempre en el dorso de estos animales utilizando la vía subcutánea. Las dosis se administraron en dos inyecciones separadas por un intervalo de 12 horas utilizando jeringas de insulina con agujas de calibre 30. Las dosis totales administradas a los ratones oscilaron entre 50 y 250 µl según las fracciones. El examen clínico de los animales se realizó siempre a las 24 horas de la primera inyección.

6.2. Curso evolutivo de la enfermedad inducida por la fracción Fab del pénfigo vulgar. Comparación con el curso evolutivo de la fracción IgG.

El curso evolutivo de la enfermedad inducida por la fracción Fab se estudió inicialmente utilizando la fracción que se había preparado a partir del suero del paciente VDV. Para ello se realizaron inyecciones a grupos de 3 ratones BALB/c recién nacidos con dosis subcutáneas únicas de 20 nmol de Fab (correspondiente a 1 mg de Fab). Los distintos grupos de animales inyectados fueron entonces examinados y sacrificados al cabo de 2, 3, 4 y 5

horas tras las inyecciones.

Posteriormente también se estudió y comparó el curso evolutivo de la enfermedad inducida por las fracciones IgG y Fab preparadas a partir del suero del paciente RL. Para ello se realizaron inyecciones simultáneas a 2 grupos de 3 ratones BALB/c recién nacidos con dosis subcutáneas únicas de 24 nmol de IgG o Fab (correspondiente a 3.6 mg de IgG y 1.2 mg de Fab). Los distintos grupos de animales inyectados fueron entonces examinados y sacrificados al cabo de 1,2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 y 24 horas tras las inyecciones.

6.3. Comparación del poder patógeno de distintas dosis de IgG y Fab de pénfigo vulgar

Se comparó la potencia de diferentes dosis de IgG y Fab preparadas a partir del suero del paciente RL. Se utilizaron las mismas fracciones que se habían utilizado en los experimentos sobre el curso evolutivo. Para este estudio se realizaron inyecciones simultáneas a 2 grupos de 4 ratones BALB/c recién nacidos con dosis subcutáneas únicas de 24, 12, 6, 3 y 1.5 nmol de IgG y Fab. Los animales fueron entonces examinados al cabo de 6 horas de la inyección.

6.4. Comparación de la patogenicidad de la Fab de pénfigo vulgar utilizando dos vías diferentes de inyección

Se inyectaron dos grupos de 3 ratones recién nacidos de tipo BALB/c con Fab preparada a partir del suero del paciente RL (concentración 5.5 mg/ml y título de inmunofluorescencia indirecta 1:1280) utilizando dos vías de inyección diferentes. El primer grupo de ratones recibió 2 inyecciones

subcutáneas de 50 μ l separadas por un intervalo de 12 horas, mientras que el segundo grupo recibió dos inyecciones intraperitoneales de 100 μ l de la misma fracción separadas por un intervalo de 12 horas. Ambos grupos de animales fueron examinados a las 24 horas de haberse administrado la primera inyección.

6.5. Examen de los animales

El examen clínico de los ratones se realizó tal como se ha descrito en otros trabajos (Rock y cols., 1990). Se observó inicialmente el aspecto de los ratones y de la piel del dorso. Posteriormente se friccionó dicha piel para obtener un despegamiento de la epidermis en los ratones afectados (signo de Nikolsky). La extensión e intensidad de las lesiones cutáneas se midió de una forma semicuantitativa. Los animales de experimentación fueron entonces sacrificados por decapitación y se obtuvieron biopsias de piel lesional y perilesional para la realización de exámenes de microscopía óptica e inmunofluorescencia directa, respectivamente. Se obtuvo también la sangre de los animales y se estudió así la presencia de autoanticuerpos en su suero mediante inmunofluorescencia indirecta.

6.6. Técnicas de inmunofluorescencia

Para la realización de los estudios de inmunofluorescencia directa e indirecta se siguieron técnicas rutinarias ya descritas (Rock y cols., 1989). La inmunofluorescencia directa se practicó sobre cortes congelados de la piel perilesional de los ratones inyectados con IgG o sus fragmentos proteolíticos. Se utilizaron anticuerpos de carnero marcados con isocianato de fluoresceína dirigidos contra Fc y F(ab')₂ humanas, y contra la fracción C3

Material y Métodos

del complemento murino (Cappel). Para los estudios de inmunofluorescencia indirecta se utilizó esófago de mono como sustrato. Todas las muestras fueron analizadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS

1.1. Inmunofluorescencia

El suero del paciente RL que se empleó para purificar la fracción IgG tenía un título de autoanticuerpos dirigidos contra los espacios intercelulares del esófago de mono de 1:320 por inmunofluorescencia indirecta. La distribución por subclases de IgG fue la siguiente: IgG₁, 1:80; IgG₂, 1:20; IgG₃, negativa; e IgG₄, 1:1280.

El suero del paciente EK tenía un título de 1:160 por inmunofluorescencia indirecta. La distribución por subclases de IgG fue la siguiente: IgG₁, 1:20; IgG₂, 1:20; IgG₃, negativa; e IgG₄, 1:640.

El suero de la paciente VDV tenía un título de 1:640 por inmunofluorescencia indirecta. La distribución por subclases de IgG fue la siguiente: IgG₁, 1:80; IgG₂, 1:20; IgG₃, negativa; e IgG₄, 1:1280.

Los sueros de voluntarios sanos utilizados en el presente estudio fueron negativos por inmunofluorescencia indirecta, no pudiéndose detectar anticuerpos contra los espacios intercelulares del esófago de mono cuando se examinaron a diluciones de 1:10 y 1:20.

1.2. Inmunoblot

Los sueros de los pacientes RL y EK así como los de los 2 voluntarios sanos fueron negativos por inmunoblot con ambos sustratos (extractos de epidermis humana y región extracelular de la desmogleína 3 recombinante). La única excepción fue el suero de la paciente VDV que al igual que el

control positivo identificó una banda de 130-kDa al emplear los extractos epidérmicos, y de 66-kDa al utilizar la desmogleína 3 recombinante. Este resultado no fue inesperado dado que en este procedimiento la proteínas se desnaturalizan y se pierden por ello los epítomos conformacionales. Esto quiere decir que una proteína que normalmente tiene una estructura terciaria pasa a adoptar una estructura lineal al realizarse el inmunoblot. Así, los anticuerpos que sólo reconozcan al antígeno proteico en su conformación nativa no pueden ser detectados utilizando esta técnica. Es por ello que sólo un 50% de los sueros de pacientes con pénfigo vulgar es capaz de identificar una banda de 130-kDa correspondiente a la desmogleína 3 por inmunoblot utilizando extractos epidérmicos (Hashimoto y col., 1990).

1.3. Inmunoprecipitación

Los sueros de los tres pacientes utilizados en este estudio inmunoprecipitaron la proteína recombinante obtenida por el sistema del baculovirus que había sido radiomarcada con I^{125} (**FIGURA 8**). Dicha positividad quedó reflejada por la presencia de una banda de 66-kDa correspondiente a la región extracelular de la desmogleína 3. Tal como se indicó en la sección de "Material y Métodos", la desmogleína 3 tiene un peso molecular de unos 130-kDa, pero la proteína recombinante utilizada en este estudio tiene 66-kDa dado que corresponde a la región extracelular.

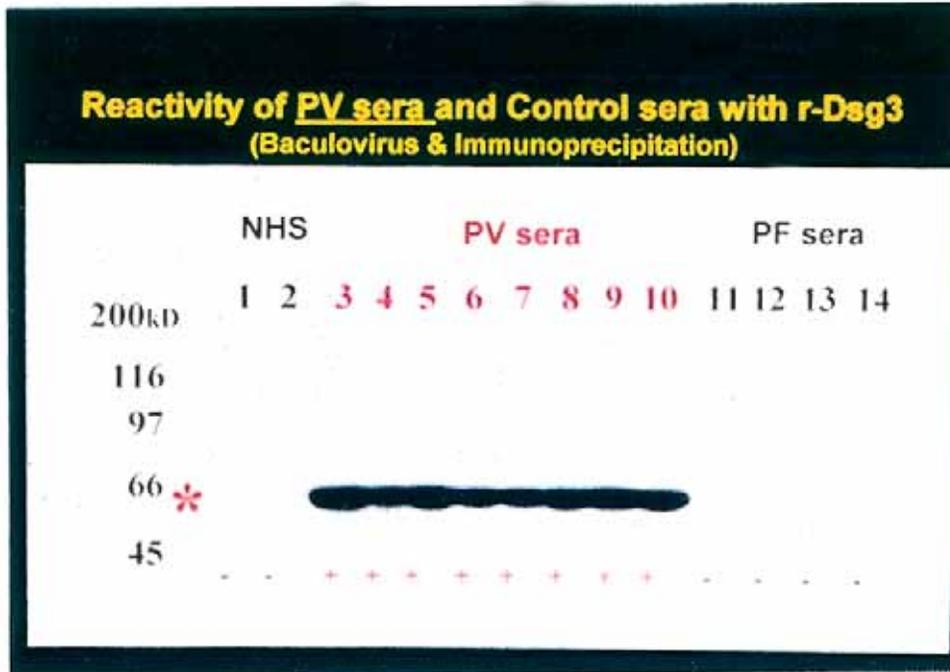


FIGURA 8. Inmunoprecipitación utilizando la región extracelular de la desmogleína 3 recombinante obtenida por el sistema del baculovirus y radiomarcada con I^{125} . Las hileras 1 y 2 corresponden al suero de voluntarios sanos; las hileras 3, 4 y 5 corresponden a los 3 sueros de pacientes con pénfigo vulgar utilizados en este estudio (RL, EK y VDV); las hileras 6 a 10 corresponden a los sueros de otros pacientes con pénfigo vulgar; mientras que las hileras 11 a 14 corresponden a sueros de pénfigo foliáceo. A la izquierda, 200, 116, 97, 66 y 45 kD indican los pesos moleculares. El asterisco indica la localización de la banda de 66-kDa correspondiente a la región extracelular de la desmogleína 3. NHS, suero humano normal; PV, pénfigo vulgar ; y PF, pénfigo foliáceo.

La presencia de autoanticuerpos contra la desmogleína 1 se investigó mediante técnicas de inmunoprecipitación utilizando fragmentos proteolíticos de epidermis bovina radiomarcados como fuente de desmogleína 1. Con dicho procedimiento se objetivó que tanto el suero de la paciente VDV como el suero de un paciente con la forma endémica de pénfigo foliáceo (*Fogo Selvagem*) que se utilizó como control positivo reconocieron unas bandas de

66 y 45-kDa, correspondientes a los fragmentos proteolíticos de la desmogleína 1 bovina (Labib y cols., 1990). Por otra parte, el resto de los sueros de pénfigo vulgar (RL y EK) y los de los 2 voluntarios sanos no reconocieron banda alguna utilizando este procedimiento.

2. FRACCIONES UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA

La concentración y los títulos de inmunofluorescencia indirecta de las distintas fracciones utilizadas en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se hallan resumidas en la **TABLA 4**.

TABLA 4. Dosis y título por inmunofluorescencia indirecta de las distintas fracciones utilizadas en el estudio.			
Suero	Fracción	Concentración (mg/ml)	Título inmunofluorescencia
RL	IgG	90	1:1280
	F(ab') ₂	25	1:1280
	Fab (2 fracciones diferentes)	5.5	1:1280
		6	1:2560
	IgG*	73	1:2560
	Fab*	11	1:2560
VDV	IgG	50	1 :2560
	F(ab') ₂	20.5	1 :5120
	Fab*	11.5	1 :5120
EK	IgG	45	1:640
	F(ab') ₂	17	1:1280
	Fab	11.5	1:2560
SVS	IgG	54	Negativa
	F(ab') ₂	40	Negativa
	Fab (2 sueros diferentes)	5.2	Negativa
		5.8	Negativa

*Fracciones empleadas en los estudios de comparación de dosis y del curso evolutivo. SVS, suero de voluntarios sanos.

3. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA PASIVA A ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

3.1. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c

Para poder determinar si la IgG de pacientes con pénfigo vulgar y sus fragmentos proteolíticos $F(ab')_2$ y Fab eran patógenas se utilizó el modelo animal de transferencia pasiva descrito por Anhalt (Anhalt y cols., 1982). En este grupo de experimentos se inyectó la fracción IgG o los fragmentos proteolíticos $F(ab')_2$ y Fab de 3 pacientes con pénfigo vulgar por vía subcutánea a ratones recién nacidos de tipo BALB/c. En todos los casos se emplearon también las fracciones obtenidas de sueros de voluntarios sanos como controles negativos.

Ninguno de los ratones inyectado con fracciones IgG, $F(ab')_2$ o Fab de sueros de voluntarios sanos mostró signos de enfermedad cutánea. Los estudios de microscopía óptica y de inmunofluorescencia de la piel y del suero de estos animales fueron siempre normales o negativos.

3.1.1. La IgG de pacientes con pénfigo vulgar es patógena en ratones recién nacidos de tipo BALB/c

Como era de esperar (Anhalt y cols., 1982), todos los ratones a los que se inyectó la fracción IgG obtenida a partir de alguno de los 3 sueros de pacientes con pénfigo vulgar desarrollaron lesiones ampollosas en la piel tal como se muestra en la **FIGURA 9**.

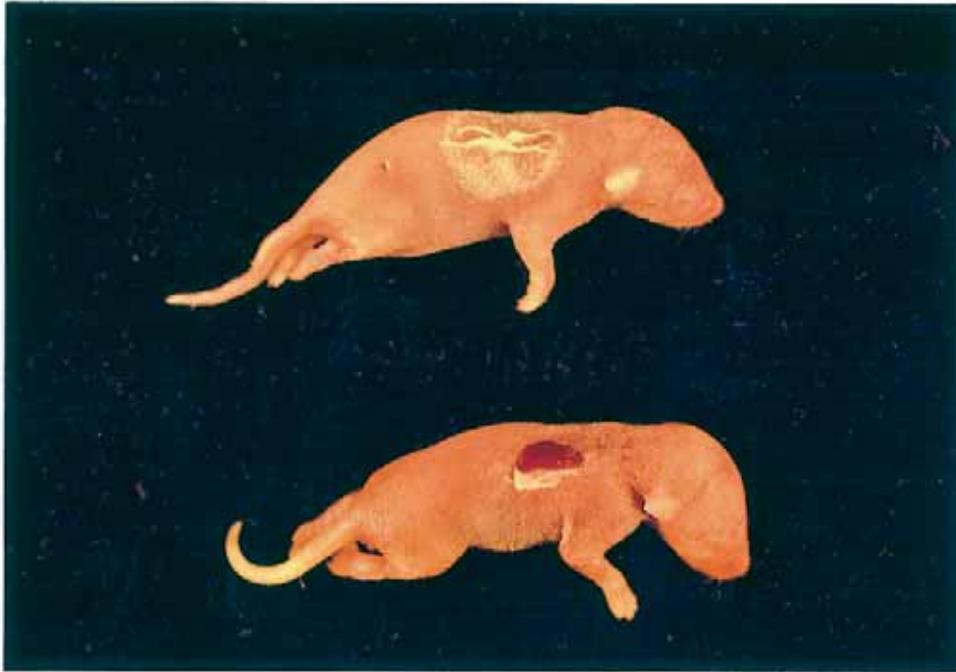


FIGURA 9. La fracción IgG de pacientes con pénfigo vulgar es patógena cuando se inyecta a ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de IgG se observa una clara positividad del signo de Nikolsky en el dorso de los ratones recién nacidos inyectados.

El examen histológico demostró que las lesiones que presentaban los animales eran ampollas suprabasales (**FIGURA 10**).



FIGURA 10. Al realizar el examen histológico de la piel lesional de un ratón recién nacido de tipo BALB/c veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de IgG de pénfigo vulgar se observa una ampolla intraepidérmica suprabasal.

Así mismo, la inmunofluorescencia directa de los ratones inyectados con IgG mostró la tinción de los espacios intercelulares de la epidermis murina cuando se utilizaban anticuerpos anti-Fc humano y/o anti-C3 de ratón (**FIGURA 11**).

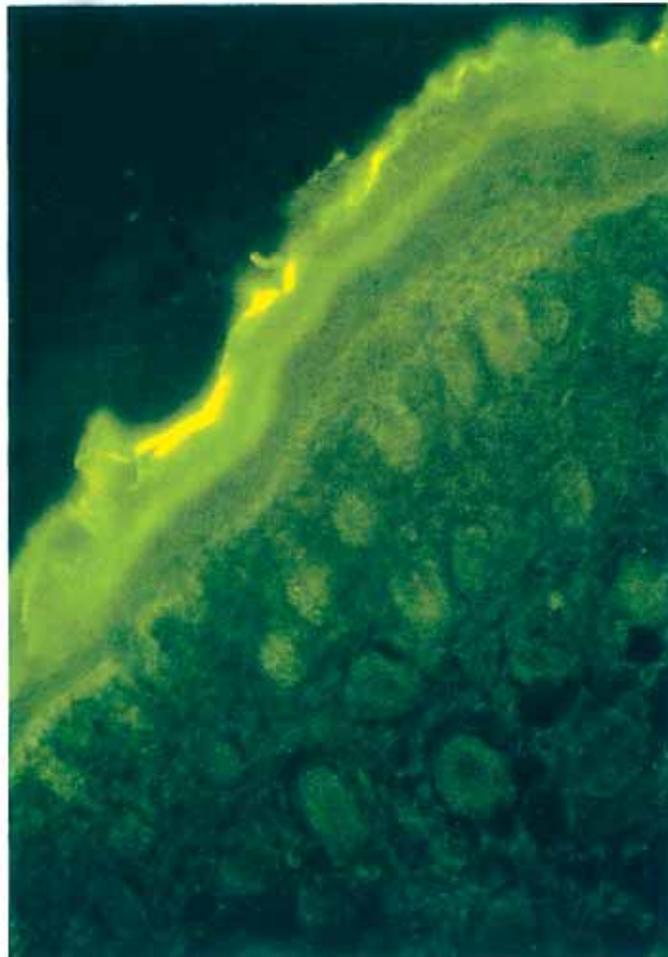


FIGURA 11. Al realizar la inmunofluorescencia directa de la piel perilesional de un ratón recién nacido de tipo BALB/c veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de IgG de pénfigo vulgar se observa una tinción de los espacios intercelulares de la epidermis murina al utilizar anticuerpos policlonales contra la fracción C3 del complemento de ratón marcados con fluoresceína.

Los títulos de anticuerpos circulantes determinados por inmunofluorescencia indirecta de los animales oscilaron entre 1:80 y 1:320. Todos los resultados de los animales inyectados con la fracción IgG de los distintos sueros se hallan resumidos en la **TABLA 5**.

TABLA 5. La IgG de pacientes con pénfigo vulgar es patógena en ratones recién nacidos de tipo BALB/c*

Fracción inyectada	Número de ratones		IF directa [†]		Títulos de IF indirecta [†]
	Inyectados	Enfermos	IgG	C3 de ratón	
SVS	5	0	-	-	-
Suero RL	27	27	+	+/-	80-320
Suero EK	8	8	+	+/-	80-160
Suero VDV	2	2	+	+/-	320

*Se inyectó subcutáneamente la fracción IgG de tres sueros de pacientes con pénfigo vulgar o sueros de voluntarios sanos (SVS) a ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Los ratones recibieron dos dosis de cada fracción y fueron examinados a las 24 horas de haberse administrado la primera inyección.

[†] La inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta se realizó con anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción Fc de la IgG humana.

3.1.2. Los fragmentos F(ab')₂ de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c

Se pudo confirmar la observación previa de que los fragmentos F(ab')₂ de pénfigo vulgar son patógenos utilizando un modelo animal experimental (Anhalt y cols., 1986a). Así, todos los ratones a los que se inyectó con fragmentos F(ab')₂ de la fracción IgG de los 3 sueros de pacientes con pénfigo vulgar desarrollaron lesiones ampollosas en la piel. Dichas lesiones fueron idénticas a las que se habían podido observar en los ratones inyectados con la molécula de IgG intacta, tal como se puede observar en la FIGURA 12.