



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

TÍTULO

***“Identificación de polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con
pénfigo vulgar del Hospital General de México”***

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

PRESENTA:

DRA. ETNA LAURA GUERRERO SÁNCHEZ

**ASESOR DE TESIS: DR. ANDRÉS TIRADO SÁNCHEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO: DRA. ROSA MARIA PONCE OLIVERA
MÉXICO, D. F. JULIO 2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TITULO

*“Identificación de polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con
pénfigo vulgar del Hospital General de México”*

Dr. Francisco González

Director de Enseñanza

Hospital General de México, O.D.

Dra. Rosa María Ponce Olivera

Profesor titular y Jefa del Servicio

Dermatología

Hospital General de México, O.D.

Dra. Ivonne Arellano Mendoza

Médico Adscrito al servicio de Dermatología

Hospital General de México, O.D.

*A mis padres y abuelos siempre por darme su amor y apoyo incondicional, mis
motores de vida.*

Agradecimientos

A la Dra. Rosa María Ponce, por su compromiso por la enseñanza, formación académica y profesional de los residentes, gracias por su apoyo y paciencia.

A la Dra. Ivonne Arellano por su disposición para ayudar en cualquier momento.

Al Dr. Andrés Tirado, gracias por las enseñanzas, los consejos y la paciencia. Gracias por su apoyo para poder realizar esta tesis y al interés para impulsar la investigación.

Al resto de mis profesores en el servicio, les agradezco infinitamente su tiempo y conocimientos, la disposición de estar “ahí” siempre y apoyarme, de todos me llevo recuerdos maravillosos.

A mis compañeros de residencia, gracias por estos tres años llenos de experiencias memorables, afecto y comprensión.

“Nunca desistas de un sueño. Sólo trata de ver las señales que te lleven a él.”

Paulo Coelho

INDICE

Resumen	6,7,8
PARTE I	
Marco Teórico (Introducción)	10
Epidemiología	10,11
Patogenia	11,12,13,14
Factores genéticos	14,15,16
Importancia y Función de CTLA-4	16,17
Manifestaciones Clínicas	19,20
Diagnóstico	20,21
Tratamiento	22,23,24,25,26,27,28,29,30
Pronóstico	30
Mortalidad	30
PARTE II	
Planteamiento del problema	31
Justificación	31
Objetivos	31
Hipótesis	31
Diseño del Estudio	32
Criterios inclusión/exclusión	32
Procedimiento	
Genotificación Polimorfismos CTLA-4	33,34,35
Análisis Estadístico	36
Aspectos Éticos y de Bioseguridad	36
Resultados	37,38,39,40,41,42,43,44,45
Discusión	46,47,48
Conclusiones	48
Referencias	49,50,51,52,53,54

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

Figura 1	37
Figura 2	38
Figura 3	38
Figura 4	38
Figura 5	38
Figura 6	38
Figura 7	39
Figura 8	39
Figura 9	39
Gráfico 1	40
Gráfico 2	41
Gráfico 3	42
Gráfico 4	43
Gráfico 5	44
Gráfico 6	45
Tabla 1	40
Tabla 2	40
Tabla 3	41
Tabla 4	41
Tabla 5	42
Tabla 6	42
Tabla 7	43
Tabla 8	44
Tabla 9	45

ANEXOS

Anexo 1	55,56,57,58
Carta consentimiento informado	
Anexo 2	59

Resumen Estructurado

“Identificación de polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con pénfigo vulgar del Hospital General de México”

Planteamiento del problema En estudios previos se ha propuesto el papel preponderante de la inmunidad celular y humoral en el desarrollo del pénfigo vulgar. Existen escasos estudios que muestran el papel de la expresión del gen *CTLA4* en la patogenia del pénfigo sobretodo en la variedad superficial; no obstante, en la literatura no se encuentran estudios que evalúen la existencia de alelos en el gen *CTLA4* en pacientes con pénfigo vulgar. **Pregunta de investigación:** ¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos del gen *CTLA4* en pacientes con pénfigo vulgar?

Objetivos.

1. Determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen (rs12990970, rs231775, rs3087243) en el pénfigo vulgar.
- 2.- Producir una genoteca de muestras de pacientes con el diagnóstico de pénfigo vulgar e individuos control de la población mexicana mestiza.

Hipótesis.

1. Si la frecuencia de polimorfismos de *CTLA4* es elevada en pacientes con pénfigo vulgar, entonces podremos determinar la influencia de dichos polimorfismos en el desarrollo de pénfigo vulgar.

Metodología. Diseño del estudio: Serie de casos

Criterios de inclusión.

1. Pacientes que durante el estudio o en fechas pasadas el paciente haya sido diagnosticado con pénfigo vulgar confirmado por criterios clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos.
2. Población mestiza mexicana (sujeto nacido en México, con padres y abuelos mexicanos).

Criterios de no inclusión.

1. Pacientes con 1-2 criterios de diagnóstico de la enfermedad.

Variables.

Variables principales.

1. Distribución alélica: Nominal (homocigoto silvestre, heterocigoto, homocigoto mutado).
2. Distribución genotípica: Nominal (AA, AG, GG, AT, TT).

Variables secundarias.

1. Tiempo de evolución de la enfermedad: Cuantitativa discreta (meses).
2. Edad: Continua (en años).
3. Sexo: Nominal (femenino, masculino)

Población estudiada

Los pacientes con pénfigo vulgar fueron reclutados de la consulta externa de Dermatología del Hospital General de México.

Tipificación del Gen CTLA4.

La genotipificación de *CTLA4* se determinará del plasma de sangre obtenida por punción periférica al momento de aceptar al paciente para participar en el estudio. La genotipificación se llevó a cabo mediante la técnica *high resolution melting* (HRM)

Resultados

Para los 3 polimorfismos, se encontró que la población estudiada en su mayor porcentaje son pacientes de genotipo silvestre. En (rs12990970), no se encontraron individuos heterocigotos, y fue en este polimorfismo donde se encontró la mayor cantidad de pacientes silvestres (77%). En el segundo (rs231775) y en el tercer polimorfismo (rs3087243) se detectaron 10 pacientes heterocigotos. En rs231775, se encontró la mayor cantidad de pacientes homocigotos (30%), para (TT). La heterocigocidad y homocigocidad predominan en el sexo masculino.

Conclusiones

- 1.- Este es el primer estudio realizado en nuestro país para detectar polimorfismos en el gen CTLA-4 de pacientes con pénfigo vulgar.
- 2.- En los 3 polimorfismos estudiados, la distribución genotípica que predominó fueron los pacientes “silvestres”.
- 3.- Se requiere llevar a cabo un estudio con controles, para en un futuro correlacionar los hallazgos genotípicos y alélicos, con las respuestas al tratamiento de los pacientes.

Palabras Clave: Pénfigo Vulgar, Polimorfismos, Gen CTLA4

“Identificación de polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con pénfigo vulgar del Hospital General de México”

PARTE I. MARCO TEÓRICO.

Introducción: Pénfigo vocablo derivado del griego “*pemphix*”, que quiere decir vesícula o ampolla. Es una enfermedad autoinmune que afecta la piel, las mucosas y los anexos, inducida por la presencia de autoanticuerpos patogénicos frente a diversas proteínas desmosómicas, lo que ocasiona un fenómeno llamado *acantólisis*. Existen tres formas clínica, histológica e inmunológicamente bien diferenciadas de pénfigo: el pénfigo vulgar y su variante vegetante, el pénfigo foliáceo y su variante eritematosa y el pénfigo paraneoplásico. El pénfigo vulgar representa el 80% de los casos de pénfigo. En los últimos años se han descrito nuevas variantes de pénfigo como el pénfigo IgA y el pénfigo herpetiforme. ^{1,2,3,4}

Historia: En 1760 Sauvages introdujo el término pénfigo en su clasificación de enfermedades ampollosas. En 1869 Hebra ordena las diversas entidades considerando al pénfigo como una enfermedad crónica ampollosa, dividiendo al pénfigo en vulgar y foliáceo. El pénfigo vegetante fue descrito por Isidor Neumann en 1886. En 1902 Besnier y Brocq realizan dos aportaciones fundamentales: la histopatología del pénfigo y el signo de Nikolsky. Auspitz en 1881 reconoce por primera vez que el pénfigo está caracterizado histológicamente por la desaparición de los puentes intercelulares entre los queratinocitos, acuñando el término *acantólisis* para describir este fenómeno. ¹

Epidemiología: La incidencia mundial anual se ha estimado en 0.76 a 6.7 casos por millón de habitantes, lo cual es variable en función de factores geográficos y étnicos.^{5,6} Es más frecuente en determinadas razas, particularmente en la raza judía de ascendencia Askenazi en el área del Mediterráneo, donde la incidencia oscila entre 1,6 y 3.2 por 100.000 habitantes cada año, lo que apoya la hipótesis de factores genéticos asociados. Afecta por igual a ambos sexos, aunque varios estudios indican un predominio del sexo femenino, presentando una relación de 1,1:1 a 2,25:1, con un pico de edad entre la cuarta y la sexta década. ^{1,5,7,8} En el Hospital General de México el tipo de pénfigo más común es el pénfigo vulgar, cuya mortalidad va del 8 al 10%, que corresponde a lo referido en la bibliografía internacional. No todos los casos de pénfigo vulgar tienen mal pronóstico; estudios clínicos de diferenciación de acuerdo con el

fenotipo han demostrado una tasa baja de mortalidad en los pacientes con la variedad mucosa dominante (1 a 17%), en comparación con los que tienen la variedad mucocutánea (34 a 42%).^{8,9}

Patogenia: La patogenia del pénfigo vulgar consiste en la formación de autoanticuerpos, principalmente IgG subclase 4, que reaccionan con la región amino terminal de las desmogleínas (Dsg) situadas en desmosomas de la superficie celular de los queratinocitos, sobre todo Dsg1 y Dsg3, inhibiendo su función adhesiva lo que desencadena cambio en la concentración de calcio intracelular y fosfocinasa C, estimulación de p58 proteincinasa mitógeno activada, regulación transcripcional y activación de las proteinasas, la activación de la apoptosis vía Fas-Fas Ligando y la presencia de autoanticuerpos que bloquean los receptores de acetilcolina de los queratinocitos lo que lleva al desensamble de desmosomas con la consecuente formación de ampollas. Los autoanticuerpos influyen en el fenotipo clínico del pénfigo vulgar, cuando abunda la antiDsg3, la afectación es predominantemente a mucosas, y ante la presencia de antiDsg3 y antiDsg1 hay mayor afección mucocutánea. También se ha observado que el colágeno VII/BP180, la desmoplaquina I y II, la desmocolina y la placoglobina, actúan como antígenos para la separación de las células epidérmicas, e incluso se ha descrito la acción de los anticuerpos contra el receptor de acetilcolina en 85% de estos pacientes.^{5,6,9,10} La presencia de autoanticuerpos en la etiopatogénesis se confirma al reproducir la enfermedad en ratones recién nacidos a los cuales se les transfirieron anticuerpos séricos, y al demostrar el paso de anticuerpos IgG por vía placentaria.¹¹ Esto último explica por qué los hijos de madres con pénfigo tienen lesiones ampollosas al nacimiento, las cuales remiten espontáneamente, al igual que los autoanticuerpos, semanas después del parto.¹⁰ Además de los autoanticuerpos IgG, los autoanticuerpos IgA y ocasionalmente los IgE reactivos frente a la Dsg 3 están presentes en las fases aguda y crónica del pénfigo vulgar.^{11,12}

También se presenta la colaboración de los linfocitos T CD4 y las células B para inducir la producción de anticuerpos antiDsg3.^{12,13} Presentando linfocitos Th1 como Th2 específicos contra la Dsg3, con niveles constantes aumentados de Th2 en las distintas fases y predominio de los Th1 en la fase activa crónica (dualidad Th1/Th2). La proporción de células Th1/Th2 condiciona una respuesta inmunológica policlonal de anticuerpos IgG1 e IgG4 frente a Dsg3.^{13,14} Las células CD4 segregan citocinas con un patrón del tipo Th2 al contactar con la Dsg3 con restricción para los alelos del HLA

*DRB1*0402* o *DRB1*1401* activando a los linfocitos B para sintetizar IgG4.¹⁴ Se han detectado niveles aumentados de IL-10, IL-6 y TNF.^{14,15}

Teorías sobre la etiopatogenia del pénfigo vulgar: Se han propuesto diferentes procesos en la etiopatogenia del pénfigo vulgar, para lo cual se han propuesto varias teorías que serán enunciadas a continuación:

Teoría compensatoria: La cual se fundamenta en la diferente expresión de Dsg 1 y 3 en la piel y mucosas para explicar el nivel de acantólisis en la epidermis. Defiende que la Dsg 1 y 3 son funcionalmente equivalentes y en caso de pérdida de una de ellas la otra podría suplir su función. Hallando que Dsg3 se localiza en la capas profundas, al contrario de Dsg 1 que se encuentra en estratos epidérmicos superficiales.^{16,17} De acuerdo a este modelo, las ampollas en pénfigo foliáceo ocurren a nivel subcórneo por que la Dsg3 presente en los estratos profundos compensa la pérdida de Dsg1. En contraste con el pénfigo vulgar, las lesiones en piel ocurren solamente cuando existen anticuerpos anti-Dsg1 y anti-Dsg3, por que la Dsg 1 está presente en todas las capas epidérmicas y compensa la pérdida de Dsg3 cuando solo existen anticuerpos anti-Dsg3.^{17,18} Sin embargo esta teoría no da respuesta a algunos hallazgos que se observan en el pénfigo vulgar, ya que existen casos que el perfil de anticuerpos no se correlaciona con el fenotipo clínico del paciente; y pruebas en ratones a las que se le administran anticuerpos antiDsg3 no presentan lesiones ampollosas espontáneas.^{18,19}

Teoría proteolítica: Postula que los anticuerpos del pénfigo vulgar inducen señales de transducción aberrantes que provocan fosforilación de la Dsg3 y la disociación de placoglobina. Esto provocaría que se formase un desmosoma con una configuración inadecuada y la inducción de transcripción del receptor de UPA (urokinase-type plasminogen activator) mediado por placoglobina. Al mismo tiempo la IgG activaría a la proteín cinasa C que estimularía la secreción de activador de plasminógeno y la expresión de su receptor en la superficie celular, provocando activación de la plasmina. La plasmina provocaría finalmente la disociación extracelular de desmosomas preexistentes.^{16,17,20}

Teoría de la disrupción física: Refiere que la unión del anticuerpo del pénfigo vulgar a la región terminal de la Dsg3 causaría una alteración de la cadherina imposibilitando la adhesión intercelular mediante la interferencia directa con interacciones homo y heterotípicas de las Dsg de los desmosomas. La unión del anticuerpo del pénfigo

vulgar a la región N-terminal de la Dsg3 produciría una alteración morfológica del desmosoma que le impediría mantener su función de adhesión intercelular. El hallazgo de integridad de los desmosomas hasta fases finales de la acantólisis junto con el hecho de que queratinocitos modificados que no contienen placoglobina no producen acantólisis tras el estímulo con IgG y que la inhibición de algunas vías de señalización intracelular disminuye o bloquea la acantólisis ha contradicho esta teoría. Además esta teoría también fue cuestionada cuando se demostró que la IgG causaba disociación de los queratinocitos.^{19,20}

Hipótesis de “encogimiento de las células basales”: Postula que la acantólisis es resultado de la retracción del citoesqueleto que provocaría encogimiento celular. Los queratinocitos se separarían por que se encogerían más de lo que los desmosomas podrían soportar y no por un defecto primario en la función de las desmosomas. Este encogimiento se encontraría limitado a las células basales debido a que las células basales son menos rígidas y se encogen más fácilmente cuando la estructura del citoesqueleto está alterada o bien porque desencadenan diferentes señales intracelulares que conducirían a una reestructuración del citoesqueleto.^{20,21} Se ha comprobado mediante microscopia electrónica que los primeros eventos que se producen tras la unión del anticuerpo del pénfigo vulgar a los queratinocitos son los cambios en el citoesqueleto con la retracción de los tonofilamentos que provoca la rotura entre los tonofilamentos y los desmosomas y culmina en el encogimiento de las células basales. Otro hecho que apoyaría esta teoría es que las células basales expresan el subtipo de receptor muscarínico M3 mientras que las suprabasales expresan el subtipo M4, esto podría favorecer a que en las células basales se desencadenen distintas vías de señalización intracelular respecto a las células suprabasales.^{22,23} Además de la presencia de distintos tipos de queratinas, las células basales expresan queratina 5 y 14, mientras que las suprabasales expresan 1 y 10. Ya que las queratinas están implicadas en el mantenimiento de la forma celular, el impacto de la unión de anticuerpos del pénfigo vulgar en la estructura y/o rigidez del citoesqueleto podría ser distinto y podría explicar porque el encogimiento celular se limita a células basales.^{23,24,25}

Teoría de las múltiples vías patogénicas de la señalización: Grando y colaboradores proponen una visión alternativa sobre la patogenia del pénfigo. Sugieren que los autoanticuerpos frente a las cadherinas desmosómicas no son los únicos ni los últimos responsables de la acantólisis, y que en este proceso

desempeñarían un papel relevante otros autoanticuerpos, en particular algunos dirigidos contra los receptores colinérgicos en la superficie de los queratinocitos.^{25,26,27} Esta teoría se basa en cinco puntos básicos: los queratinocitos son capaces de sintetizar, secretar y degradar acetilcolina; los queratinocitos poseen receptores para la acetilcolina, tanto de tipo muscarínico como nicotínico, y expresan también una molécula de la familia de las anexinas, la penfaxina, capaz de unirse a la acetilcolina; la acetilcolina y otros agonistas colinérgicos estimulan la adhesión intercelular entre los queratinocitos, mientras que los antagonistas favorecen su disociación; en los pacientes con pénfigo se detectan algunos anticuerpos dirigidos contra receptores colinérgicos presentes en los queratinocitos y, por último, la acantólisis inducida con el suero de los pacientes en algunos modelos experimentales de pénfigo es revertida por agentes agonistas colinérgicos.^{26,27}

Etiología: Las enfermedades autoinmunes (EAI) afectan al 5% de los seres humanos y constituyen uno de los problemas de salud más frecuentes y menos entendidos en la actualidad. Son enfermedades multifactoriales en las cuales están involucrados factores genéticos y ambientales aun no esclarecidos, que condicionan una respuesta inmunológica del individuo contra los desmosomas epidérmicos. A continuación se exponen los factores conocidos en la etiopatogenia del pénfigo.^{28,29,30}

Factores genéticos: Desde el punto de vista genético, existe una gran diversidad de genes que se han relacionado a la enfermedad, comenzando desde las clásicas asociaciones con el sistema HLA, hasta recientes proteínas asociadas a la actividad y funcionalidad de las células T.^{28,30} La activación óptima de los linfocitos T ocurre como resultado de la unión del receptor del linfocito T (TCR) con una célula presentadora de antígeno que expresa sobre su superficie un péptido antigénico específico ligado a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); CD28 es la principal molécula coestimuladora. La interacción con sus ligandos B7.1 (CD80) y/o B7.2 (CD86) traduce una señal que aumenta la proliferación de células T, la secreción de citoquinas y una respuesta sostenida de los linfocitos T. Contrariamente, el antígeno 4 (homólogo de CD28), asociado al linfocito T citotóxico CTLA4 (CD 152), inhibe las respuestas de las células T; estas interacciones, que algunos autores han denominado “sinapsis inmunológica”, se complementan con la participación de moléculas de adhesión ICAM-1.³⁰

Se han publicado casos de pénfigo en gemelos monocigotos y la presencia de anticuerpos contra la superficie de queratinocitos en el suero de los familiares de los pacientes.⁷ Sin embargo, también se presenta pénfigo en únicamente uno de los gemelos monocigotos, lo que sugiere que la predisposición genética no es suficiente para la aparición de la enfermedad, y que se requieren factores externos.^{30,31}

Se piensa que los genes de los complejos mayores de histocompatibilidad clase II tienen un papel importante en la inmunopatogenia del pénfigo. El 95% de las tres variantes de HLA (DRB1 * 04, DRB1 * 08 y DRB1 * 14) se asociaron con un aumento significativo en el riesgo de pénfigo vulgar.⁶³ En los judíos Askenazi predomina el antígeno HLA-DR4, de los cuales el 95% portan el alelo *DRB1*0402*.^{30,31} Se encontró una fuerte asociación entre el pénfigo vulgar no endémico con los alelos *DRB1*0102* y *DRB1*0404*.¹ En México, Vega-Memije en 2001 realizó un estudio de 25 pacientes con pénfigo, 18 pacientes con pénfigo vulgar y 7 con pénfigo foliáceo, en el que encontraron predominio del HLA-DR14 (DR6) en comparación con la población sana control.⁹

El polimorfismo alélico en el pénfigo vulgar se traduce en alteraciones menores en las secuencias de aminoácidos de la cadena 1 del HLA-DR que permiten la presentación de péptidos de Dsg3 o Dsg1 a las células Th1, a diferencia de lo que ocurre en individuos sin pénfigo vulgar.^{6,9} Respecto a HLA clase I se han reportado moléculas HLA-A3, A10 37, 38 A 26, y HLA-B15, B35 39, 40 B38, B44 41, 40 y B60.³⁷ Su participación es poco clara, puede estar relacionada con los alelos HLA en II, o contribuir al riesgo asociado a la enfermedad. Los HLA clase Ib (alelos HLA-E, F, y G) se ha reportado un aumento de la frecuencia de delección 14-pba HLA-G en pacientes con pénfigo vulgar, su función no es clara, puede ser un modulador en la discriminación y desarrollo de autoinmunidad.^{5,32}

Se ha observado que los pacientes con una enfermedad autoinmune tienen una mayor probabilidad de desarrollar una o más de estas entidades, lo cual también se presenta en el pénfigo vulgar, ya que en un estudio de 171 pacientes, se encontró que el 21% presenta una comorbilidad autoinmune, siendo la enfermedad tiroidea la más asociada, presentándose en el 50% de los casos.⁵ También se encontró un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes entre familiares del paciente con pénfigo vulgar, hallando que 48% tenían uno o más familiares con alguna enfermedad autoinmune. Siendo la diabetes tipo 1 la de mayor frecuencia, seguido por la

enfermedad tiroidea. El pénfigo vulgar se encontró en 2,9% de los familiares. Aunque existen casos de pénfigo vulgar familiar, estos son raros. Con más probabilidades en familiares de primer grado, en comparación con parientes de segundo grado y tercer grado.^{5,32}

Más recientemente, se investigó la asociación genética entre la proteína tirosina fosfatasa N22 (PTPN22) y el pénfigo vulgar, sus alteraciones afectan el umbral para la activación de linfocitos T, llevando a una propagación desinhibida de cascada de receptor de células T, asociado a varias enfermedades autoinmunes. Sin embargo, en un estudio de 102 pacientes con pénfigo vulgar y 102 controles sanos, no se encontró asociación.^{5,32}

Importancia y función de la molécula CTLA-4: La región del cromosoma 2q33 alberga genes que codifican moléculas coestimuladoras, como el CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), deriva su nombre de haber sido identificado originalmente como el cuarto cDNA de una genoteca murina de células T citotóxicas. Tiene mucha homología estructural a CD28, lo que hace pensar que ambos genes provienen de un ancestro común. Se expresa en células CD4 y CD8 solamente cuando están activados a niveles 10 a 100 veces menores que los correspondientes a CD28. Se une con CD80 y CD86 mostrando una constante de disociación 20 a 50 veces más alta. Alcanza expresión máxima a las 48-72 horas después de la activación de las células T; tiene una función reguladora negativa sobre los linfocitos T, su estructura contiene un dominio extracelular de 5 unidades, 1 dominio transmembrana y 1 cola citoplasmática, se han detectado la presencia de varias isoformas. La inhibición de las respuestas de las células T inducida por CLTA-4 se debe a la desfosforilación de proteínas. La capacidad de esta proteína de actuar como punto de fijación de ligandos ha despertado interés como diana terapéutica potencial de enfermedades autoinmunes.^{30,32} Otras moléculas coestimuladoras son del grupo de diferenciación de la molécula 28 (*cluster of differentiation molecule 28 -CD28-*) y la molécula coestimuladora inducible (*inducible costimulatory molecule -ICOS-*), los cuales también juegan un papel crucial en la activación y regulación de células T. El CD28 está involucrado en la cooperación de Linfocitos T y B; se encuentra en el 95% de las células CD4+ y en el 50 % de las células CD8+. El cual provee una potente señal estimuladora de los linfocitos T regulando la producción de IL-2. *CTLA-4* se expresa en células T luego de la activación, envía señales que inhiben la transcripción de IL-2 y la progresión de las células T en el ciclo celular, el efecto directo es la inhibición de la señal generada por la molécula CD28. Las mutaciones que alteren la función o

expresión del *CTLA4* pueden producir una activación exagerada de las células T, llevando al desarrollo del fenómeno autoinmunitario.^{5,30,33,34}

Basados en su papel crucial en la homeostasis inmunológica, *CTLA4* se ha convertido en uno de los principales genes de interés en la investigación y ha sido considerada como un objetivo para la inmunoterapia.^{30,34} Se ha encontrado asociación entre *CTLA4* y vitíligo al presentarse con otras enfermedades autoinmunes. En alopecia areata, se han estudiado 8 polimorfismos, de los cuales 6 han sido asociados con casos severos, particularmente el polimorfismo rs3087243.^{35,36,37,38} El polimorfismo 49 y CT60 del *CTLA4* representan mayor riesgo de presentar artritis reumatoide.³⁹ El polimorfismo CT60 se asocia a psoriasis, aunque otros estudios lo descartan.^{30,39} La presencia del polimorfismo 49 en el alelo G, está asociado a diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, enfermedad celiaca, asma y dermatitis atópica.⁴⁰ También se ha encontrado una relación inversa entre la supervivencia de las células tumorales y la autoinmunidad. La presencia del genotipo *CTLA4* CT60 GG está asociado a una disminución del carcinoma basocelular y epidermoide.^{40,41} En cuanto al pénfigo, se han realizado varios estudios en busca de asociación de *CTLA4* y pénfigo foliáceo, sin ser concluyentes. Algunos refieren polimorfismos en el cromosoma 2q33 y 3q21 causan susceptibilidad a presentar pénfigo, la mayoría afectando *CTLA4*, probablemente asociado al coestimulador inducible de células T (ICOS) y CD86.^{34,41} En un estudio realizado a pacientes pénfigo foliáceo, comparado con controles sanos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ante la presencia de polimorfismos +49A/G del gen *CTLA4*, aunque no descartan la posibilidad de que esté asociada a la función anormal de los linfocitos T en el pénfigo.⁴²

La molécula *CTLA-4* ha sido el blanco de muchas enfermedades autoinmunes, sin embargo no se han realizado estudios acerca su asociación y polimorfismos en el pénfigo vulgar, con lo cual se podrían plantear estrategias novedosas para inducir inmunosupresión.^{41,42}

Fármacos: La mayor parte suelen tener un grupo tiol (-SH) en su molécula o contienen un enlace disulfuro capaz de liberar grupos tiol. Así como los que contienen azufre cuyo metabolismo libera grupos tiol, incluyendo penicilinas, cefalosporinas y piroxicam. Otros medicamentos asociados son: rifampicina, derivados de la pirazolona, inmunomoduladores, captopril, pencilamina, fenobarbital, levodopa y propranolol.^{43,44,45} El tiempo transcurrido entre la administración del medicamento y la aparición de la enfermedad va de semanas a meses. Se presenta inicialmente como lesiones

inespecíficas, exantemas o eritemas anulares, que semejan una reacción medicamentosa. Algunos fármacos inducen acantolisis bioquímica, por alteración directa de la superficie celular del queratinocito que impide la adhesión celular. Mientras que otros desencadenan una acantolisis inmunológica, formando un neoantígeno con la subsiguiente aparición de anticuerpos.^{48,49}

Factores hormonales: Se asocian con la aparición o evolución del pénfigo, basados en algunos casos que han sufrido exacerbación en el embarazo o su aparición en el mismo.^{1,8}

Radiaciones ultravioleta: Se ha observado exacerbación después de la terapia con luz ultravioleta y psoralenos (PUVA), radiación ultravioleta B (UVB), después de la exposición solar. Ya que promueve la acantolisis con el depósito de IgG y C3 en los espacios intercelulares.^{17,18} Se ha propuesto diversos mecanismos de daño, el primero consiste en que la exposición solar daña la membrana celular causando mayor capacidad de unión de los antisueros a las superficies del queratinocito, semejante a lo que ocurre en el lupus eritematoso. El segundo mecanismo propone que la luz UV puede modular señales intracelulares cuando los anticuerpos patógenos se ligan a la Dsg de los queratinocitos. Una tercera hipótesis considera que los mediadores inflamatorios liberados de los queratinocitos y/o mastocitos por la exposición a luz UVB, como IL-1 y 8, el factor de necrosis tumoral y el factor estimulante de colonias macrocíticas y granulocíticas, podrían ser los responsables de la aparición de las lesiones ampollosas.^{1,26}

Dermatitis por contacto: Existen casos reportados que se han desarrollado después de contacto con diversos productos (ajo, pesticidas, fenoles e imiquimod), produciendo una alteración en la superficie cutánea, con la formación de neoantígenos.⁸

Radiaciones ionizantes: Se han descrito algunos casos de pénfigo inducidos por radioterapia.²⁶

Cicatrices quirúrgicas: Secundarios a injertos, cirugía mamaria o rinoplastia. Con un intervalo de aparición muy variable, entre 2 meses a 3 años. Pudiera ser un fenómeno isomórfico, que alteraría la capacidad antigénica de las estructuras cutáneas.^{2,23}

Quemaduras: Provocan la aparición transitoria de autoanticuerpos semejantes a los del pénfigo en el suero de algunos pacientes quemados.²⁸

Dieta: Algunos alimentos con una estructura molecular semejante al grupo tiol como los derivados del ajo, cebolla o los puerros; o con grupos isotiocianatos como la mostaza, los fenoles como el aspartame o los taninos como la mandioca y el mango, se han implicado en el pénfigo.²⁹

Infecciones: Los más asociados son el virus del herpes simple, el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus y el virus herpes humano tipo 8. Estos podrían ser infecciones oportunistas en pacientes inmunosuprimidos, pero en algunos casos podrían tener una relevancia patogénica. Las toxinas exfoliativas del estafilococo dorado actúan sobre la desmogleína 1.^{26, 27, 28}

Manifestaciones clínicas: En el 50-70% el inicio es con lesiones mucosas, siendo la mucosa oral es la más frecuentemente afectada, en forma de erosiones irregulares, grandes y extensas, que dejan al descubierto una mucosa hiperémica, o a veces cubiertas de lesiones blanquecinas. En los labios pueden existir erosiones y costras con un collarite descamativo o con restos epidérmicos. Suelen ser dolorosas y son resistentes al tratamiento. En casos más graves se encuentran lesiones en la faringe, laringe, esófago, mucosa anal y genital, causando ronquera, disnea y disfagia. Las lesiones pueden permanecer solo en mucosas durante aproximadamente cuatro meses antes de extenderse al resto de la piel.¹ En el 10 o 15 % puede iniciarse con manifestaciones cutáneas, bien como una ampolla única, o como brote de lesiones múltiples más o menos diseminadas. La ampolla es el elemento primordial de contenido seroso, purulento o hemorrágico, consistencia flácida, que en ocasiones se encuentra a tensión, asentados sobre una base eritematosa, posteriormente se desecan o se rompen, siendo reemplazadas por exulceraciones y costras; dejando una pigmentación residual.^{2,4} Se presenta signo de Nikolsky, que consiste en la demostración del despegamiento epidérmico al hacer una presión tangencial con el dedo sobre la superficie de la piel, con sensibilidad de 38% en la forma directa contra 69% en la forma marginal, y especificidad de 100 contra 94%, respectivamente.²⁹ También se presenta el signo de Asboe-Hansen, el cual consiste en el aumento periférico del tamaño de la ampolla al presionar verticalmente sobre la superficie de la misma.^{3,4}

Las uñas pueden estar afectadas, en el 22% de los casos, siendo la primera manifestación de la enfermedad o presentándose junto con otras manifestaciones clínicas. Presentando paroniquia, onicosquicia, onicomadesis, hemorragias subungueales, alteraciones de la coloración o líneas de Beau, que afectan sobre todo al 1º y 2º dedos de la mano, sin relación con la duración o gravedad de la enfermedad.

2,6

Índices de severidad: Existen varios índices de severidad de la enfermedad, sin que haya consenso respecto a cuál es el más adecuado. Ikeda y colaboradores propusieron una estadificación en leve, moderado y severo de acuerdo a: 1) porcentaje de superficie cutánea afectada; 2) signo de Nikolsky; 3) número de lesiones nuevas por día, y 4) el porcentaje de lesiones orales.^{54,55} El-Darouti y colaboradores sólo toman en consideración el porcentaje de superficie corporal afectada y clasifican al pénfigo en leve cuando es menor de 30%, moderado entre 30 y 60%, y severo, cuando es mayor de 60%.⁵⁵ Existe también el ABSIS (*Autoimmune Bullous Skin Disorder Intesity Score*), que incluye criterios como la regla de los 9, el grado de erosión o costra seca y los alimentos tolerables, pero es poco práctico.⁴⁹

Diagnóstico

Citodiagnóstico (Prueba de Tzanck): Es una prueba de bajo costo y fácil de realizar en la cual se observan las células acantolíticas. Tiene sensibilidad de 100%, pero especificidad de 43.4%. No puede determinar el tipo de pénfigo.^{3,13}

Histopatología: En mucosas puede ser difícil encontrar una ampolla intacta; en estos casos es mejor realizar la biopsia de una zona aparentemente sana de mucosa contigua a un área erosionada. Lo que se observa es edema intercelular en las capas más inferiores de la epidermis, con desaparición de los puentes intercelulares, conduciendo así al fenómeno de acantólisis. Cuando la acantolisis progresa, da lugar a la ampolla intraepidérmica suprabasal cuyo suelo está formado por una hilera de células basales, que se disponen como una «hilera de lápidas», y cuyo techo se encuentra constituido por el resto de la capa espinosa, granulosa y la córnea. En el interior de la ampolla se suelen encontrar queratinocitos acantolíticos, aislados o en grupos, con morfología redondeada, núcleo pequeño e hiper cromático, con frecuencia rodeado de un halo y citoplasma homogéneo. El proceso inflamatorio en la dermis es escaso en las fases precoces y queda limitado a un infiltrado linfocítico perivascular, acompañado de edema dérmico. En ocasiones el número de eosinófilos en dermis es

elevado, acompañando a la espongiosis eosinofílica. Más tarde el infiltrado inflamatorio dérmico es mixto con neutrófilos, linfocitos, macrófagos y eosinófilos.¹

Inmunofluorescencia directa: Se hallan depósitos de IgG en el espacio intercelular de los queratinocitos hasta en 90% de los casos, y de C3 en 30 a 50%, en un patrón llamado en “panal de abeja”. Es una prueba sensible y específica que confirma el diagnóstico. Se puede utilizar como un marcador muy fiable de la remisión del pénfigo, pues cuando es positiva confiere un riesgo de recaída de 44 a 100%, mientras que cuando es negativa el riesgo disminuye a 13-27%.^{4,51}

Inmunofluorescencia indirecta: Detecta anticuerpos IgG circulantes en el suero de los enfermos. Es positiva en 80 a 90% de los casos y puede ser negativa en pacientes con enfermedad localizada o en fase temprana. Ya que los títulos están en relación con la extensión y con la actividad de la enfermedad, pueden ser un marcador de recaída, pues su presencia representa un riesgo de 57% y su ausencia, de tan sólo 24%.^{4,51}

Medición de anticuerpos por técnica ELISA: Es un método que determina anticuerpos contra Dsg, al detectar los antígenos contra los que van dirigidos. Su sensibilidad y especificidad son similares a las de la inmunofluorescencia indirecta, y sirve también para vigilar actividad de la enfermedad.^{6,51}

Inmunoblot e Inmunoprecipitación en gel: Las dos técnicas detectan antígenos epidérmicos a los que se unen los anticuerpos circulantes de pacientes con pénfigo. La fuente del antígeno en la inmunoprecipitación es el queratinocito cultivado, que se incuba con el suero previamente a la electroforesis en gel. Al no desnaturalizar las proteínas, permite la detección de anticuerpos contra epítomos conformacionales en el pénfigo. La inmunoprecipitación es más sensible que el inmunoblot, pero tiene las desventajas de que requiere trabajar con radiactividad, es complicada de realizar y costosa.^{1,51} El inmunoblot utiliza extractos de epidermis o dermis para conseguir los antígenos utilizando dodecil sulfato sódico y la electroforesis en gel depoliacrilamida, a los que se añade posteriormente el suero con los autoanticuerpos circulantes. Al producirse una desnaturalización de los antígenos durante el proceso de análisis sólo se detecta anticuerpos que reaccionan contra epítomos secuenciales. Recientemente se han utilizado ambas técnicas para la detección de la fracción extracelular de las desmogleínas obtenidas de forma recombinante.¹

Diagnóstico Diferencial: En lesiones orales, el diagnóstico diferencial incluye: estomatitis herpética, eritema multiforme, liquen plano ampolloso y penfigoide cicatricial. En cuanto a las lesiones cutáneas deben distinguirse de otras formas de pénfigo: penfigoide ampolloso, eritema multiforme, enfermedad de Haley-Haley y dermatitis acantolítica transitoria.⁴

Tratamiento: El tratamiento consiste en suprimir la producción de autoanticuerpos con el objetivo de curar las lesiones existentes, abortar los brotes de actividad de manera temprana y prevenir la aparición de lesiones nuevas. Se deben tener en cuenta los conceptos actuales que determinan la respuesta al tratamiento: 1) control de la enfermedad: ausencia de lesiones nuevas durante dos semanas como mínimo, o curación de 80% de las lesiones previas; 2) remisión completa: ausencia de lesiones nuevas o antiguas en un lapso de dos meses; 3) remisión parcial: aparición de lesiones transitorias nuevas que curan en una semana en un periodo de dos meses, y 4) recaída: tres o más lesiones nuevas que no curan en una semana o la extensión de las lesiones establecidas en un paciente que ya estaba en control.^{52,53} La elección del tratamiento debe individualizarse, basándose en la severidad de la enfermedad, características del paciente como edad, estado general o padecimientos preexistentes, y de las características del fármaco, como: inicio de acción, efectos adversos y costo.⁵³ Antes de iniciar tratamiento debe realizarse biometría hemática, pruebas de función hepática, química sanguínea, electrolitos séricos, radiografía de tórax y análisis urinario. En caso de que se elija azatioprina, se recomienda determinar las concentraciones séricas de tiopurina metiltransferasa, pues la dosis se establece de acuerdo con ellas.^{1,50} El tratamiento consta de tres fases: *Fase de control.* La intensidad del tratamiento se incrementa rápidamente hasta conseguir suprimir la actividad de la enfermedad. Con duración de semanas. *Fase de consolidación.* Se mantiene la dosis de medicamentos necesaria para el control hasta que la mayor parte de las lesiones haya desaparecido; esta fase debe durar semanas, no meses. *Fase de mantenimiento.* Consiste en el descenso paulatino de las dosis hasta conseguir el nivel más bajo de tratamiento que suprima la aparición de lesiones nuevas con el objetivo de suspender el fármaco posteriormente.¹ Puede iniciarse tratamiento con prednisona a dosis de 1 mg/kg al día. Si no hay respuesta, debe incrementarse la dosis hasta 3 mg/kg diarios para alcanzar la remisión de la enfermedad. De no ser así, y de acuerdo con las condiciones específicas del paciente, debe considerarse la administración de metilprednisolona en pulsos o la adición de un coadyuvante como azatioprina o

ciclofosfamida. Si no hubiera respuesta, puede indicarse mofetil micofenolato, inmunoglobulina o plasmaféresis, y en casos persistentes, rituximab o combinaciones de éste con inmunoglobulina.^{52,53,54} Según un estudio la remisión completa se consigue en el 38, 50 y 75% de los pacientes a los 3, 5 y 10 años, respectivamente, después del diagnóstico. Los pacientes con un cuadro clínico moderado o leve y con una respuesta rápida al tratamiento tienen más probabilidades de conseguir una remisión completa. La decisión de suspender el tratamiento se basa en una remisión clínica prolongada y en los hallazgos de la inmunofluorescencia directa o indirecta.¹

Esteroides

Corticoides orales: Son el tratamiento de primera elección (nivel de recomendación A), ya que conjuntan bajo costo y efecto rápido (en dos a tres semanas dejan de aparecer lesiones nuevas y en seis a ocho semanas se curan las existentes). Antes de su aplicación, la mortalidad del pénfigo era del 75 %, cuando se inició el tratamiento con esteroides descendió hasta el 30 % y continuó descendiendo en las décadas siguientes hasta un 5,9 % coincidiendo con la introducción de la terapia adyuvante con inmunosupresores. En el 75% se los casos se inicia prednisona y, de ellos, el 26 % añade inmunosupresores inmediatamente.^{1,52} Una vez alcanzada la remisión completa, y después de la etapa de mantenimiento (seis a diez semanas), se pueden seguir diversos esquemas de reducción de esteroides: Cada dos semanas se reduce 50% la dosis; o cada dos a cuatro semanas se quitan 10 a 20 mg. Una vez que se llega a 40 mg diarios, comienza a disminuirse la dosis del segundo día 5 a 10 mg cada dos a cuatro semanas, hasta que se alcanzan 40 mg cada 48 horas. Continúa la disminución de la misma manera hasta llegar a una dosis de mantenimiento de 5 mg cada 48 horas.⁵⁵ En las dosis superiores a 60 mg/día se reducen 20 mg/día cada semana; en dosis de 30 a 60 mg/día se reducen 10 mg/día, también cada semana, y en dosis menores a 30 mg/día se reducen 5 mg/día por semana.⁵⁵ Se deben vigilar efectos secundarios como: diabetes, osteoporosis, supresión del eje hipotálamo-hipofisario, úlceras pépticas, incremento de peso, predisposición a infección, cambios en la conducta, miopatía proximal, síndrome de Cushing. Por tal razón, se deben evaluar periódicamente: tensión arterial, peso, glucosa, triglicéridos y potasio, y hacer una valoración oftalmológica en busca de cataratas. Es importante administrar omeprazol ó ranitidina en pacientes con antecedentes de úlcera péptica. Administración de complementos de calcio y vitamina D, así como realizar densitometría ósea lumbar y femoral.^{52,55} La finalidad es inducir una remisión completa que permita suspender el tratamiento y reducir los efectos secundarios.⁵⁵

Corticoides en terapia pulsátil: Están indicados en casos de enfermedad severa o resistente (nivel de recomendación C). Su finalidad es conseguir una remisión rápida, minimizando los efectos secundarios. Consiste en la administración intravenosa de metilprednisona 1 g diario, o dexametasona 300 mg, durante 5 días en infusión de 2 o 3 h. Inducen remisión en el 50 % de los pacientes. Algunos esquemas incluyen ciclofosfamida o la administración simultánea de dosis bajas de esteroides. Los efectos secundarios menores son eritema, trastornos del sueño, cambios de humor y ganancia de peso. Así como complicaciones graves, por ejemplo, convulsiones, hipertensión, trastornos en el balance electrolítico, cardiopatía y pancreatitis.^{1,52}

Corticoides tópicos o intralesionales: En pénfigo leve pueden ser suficientes para controlar el cuadro clínico sin los efectos secundarios de los esteroides sistémicos; en otras ocasiones los corticoides tópicos pueden ayudar a reducir la dosis de esteroides sistémicos.^{1,52} A pesar de esto, su principal indicación es en pacientes con afección de la mucosa oral, en quienes se recomiendan corticoesteroides de moderada a alta potencia, como el fosfato sódico de betametasona en tabletas de 0.5 mg disueltas en 10 mL de agua en colutorios durante cinco minutos. En lesiones aisladas pueden aplicarse acetónido de triamcinolona a 0.1%, acetónido de fluocinolona a 0.05%, propionato de clobetasol de 0.05% a 0.1% y beclometasona en inhalador.³⁹ Los corticoides intralesionales pueden ser útiles para pénfigo de gravedad intermedia con escasas lesiones, o lesiones recalcitrantes de la mucosa oral. No existe ningún estudio controlado acerca de su eficacia, si después de dos o tres inyecciones la lesión no ha remitido, deberá suspenderse.^{1,52}

Terapia adyuvante: Bystrin recomienda la terapia adyuvante únicamente si existe contraindicación relativa al uso de esteroides, si aparecen efectos secundarios y si la dosis de esteroides no puede ser reducida por brote de la actividad de la enfermedad.

55

Azatioprina: Es un antimetabolito de purinas indicado como coadyuvante o como monoterapia en casos leves (nivel de recomendación B), obteniendo remisiones entre el 28 y el 45 %. Utilizado como monoterapia, se necesita un periodo de al menos 6 semanas para lograr su efecto. La dosis es de 1-3 mg/kg/día, la cual debe ajustarse de acuerdo con los niveles de tiopurina-metil transferasa para evitar pancitopenia, utilizando 0,5 mg/kg en niveles enzimáticos muy reducidos. Los efectos secundarios

más frecuentes son la pancitopenia, la hepatitis colestásica, la toxicidad gonadal y el posible riesgo de neoplasia a largo plazo.^{56,57}

Ciclofosfamida: Es un agente alquilante de ADN que inhibe la inmunidad humoral y celular; está indicado como alternativa al tratamiento (nivel de recomendación B). Es uno de los inmunosupresores más efectivos para el tratamiento del pénfigo. Puede utilizarse por vía oral o en forma de pulsos, asociada o no a esteroides orales, o como tratamiento adyuvante, a dosis de 50-200 mg/día (2-3 mg/kg/día). La administración en pulsos con corticoides orales (dexametasona 100-136 mg en 3 días consecutivos) tiene la ventaja que puede disminuir el riesgo de efectos secundarios y el potencial oncogénico asociado con el uso diario de ciclofosfamida, así como también induce tasas de remisión completa de incluso 63%. Su acción inicia dos a cuatro semanas después de darlo por primera vez. En un estudio se demostró que la ciclofosfamida presentó remisión clínica e inmunológica más rápida, así como mayor proporción de pacientes con mantenimiento de la remisión durante 5 años y tiempo de recaída más prolongado en comparación con prednisona, azatioprina y ciclosporina.^{58,59} Como efectos secundarios agudos se presenta pancitopenia (predominando leucopenia), elevación de transaminasas, cistitis hemorrágica, o infecciones por *Pneumocystis jiroveci*, y a largo plazo pueden aparecer enfermedades linfoproliferativas, cáncer de vejiga y esterilidad. Sus complicaciones durante la administración son eritema, palpitaciones, debilidad generalizada y malestar. Los efectos secundarios son más limitados cuando se utiliza en forma de dosis inmunoablativas.⁵⁸

Mofetil micofenolato: Es un inmunosupresor selectivo de linfocitos que inhibe la síntesis de purina. Está indicado para casos resistentes o si falla la azatioprina o la ciclofosfamida (nivel de recomendación B). Es seguro y efectivo a dosis de 35-45 mg/kg/día, su acción inicia cuatro a ocho semanas después de su primera administración, y produce tasas de remisión de 71 a 100%. En un estudio con prednisona y mofetil micofenolato se ha reportado remisión completa de la enfermedad en el 89% de los casos, presentándose en 4.5 meses en el 75% de los pacientes, con duración de 1 año sin lesiones. Sus efectos secundarios son afectación gastrointestinal (vómito, diarrea y náuseas) siendo las más frecuentes (20%), mielosupresión, riesgo de contraer infecciones oportunistas y de padecer neoplasias.^{59,60}

Ciclosporina: Aunque inicialmente en algunos casos fue efectiva, un reciente estudio secuencial aleatorizado y controlado que evalúa la eficacia de la prednisona frente a

ciclosporina a dosis de 5 mg/kg de peso por día, concluye que la ciclosporina no añade ventaja al uso de esteroides.⁶¹

Clorambucilo: Inhibe la síntesis de ADN de las células B, es un agente alquilante similar a la ciclofosfamida y tiene mayor poder inmunosupresor que la azatioprina. Carece de la toxicidad vesical de la ciclofosfamida, pero causa supresión de la médula ósea e inducción de leucemia mieloblástica aguda (*nivel de recomendación C*).⁶²

Metotrexato: Es un antimetabolito análogo del ácido fólico. Su acción inicia cuatro a ocho semanas después de administrarlo por primera vez, y está indicado para pacientes en quienes no puede disminuirse el corticoesteroide. Se prescribe a dosis de 12 mg/semana, y cuando se agregan corticoesteroides orales las tasas de remisión son, incluso, de 67% (*nivel de recomendación C*). Sus principales efectos secundarios son: pancitopenia, trombocitopenia y leucopenia, úlceras intestinales, alopecia, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad reversible.⁶³

Tacrolimus: Sólo se ha reportado un caso en el que se aplicó tacrolimus al 0.1% (de manera adicional al tratamiento con esteroide y fármaco ahorrador de éste) a las lesiones resistentes, las cuales tuvieron buena respuesta clínica (*nivel de recomendación C*), sin embargo, los datos que apoyan su uso son limitados.^{55,58}

Tetraciclinas + nicotinamida: La tetraciclina tiene un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, mientras que el mecanismo de acción de la nicotinamida en el pénfigo vulgar se desconoce. Las dosis recomendadas son 2 g de tetraciclina y 1.5 g de nicotinamida, ambas diariamente. Están indicadas como coadyuvantes para casos moderados (*nivel de recomendación C*). Presentan resultados controvertidos, ya que los estudios no son controlados y el grado de afectación de los pacientes no se especifica. Los efectos secundarios que se presentan con nicotinamida, son eritema facial súbito y cefalea, y con la tetraciclina, la hiperpigmentación cutánea. La asociación de corticoides y tetraciclina presento una respuesta más rápida.⁶⁴

Biológicos

Rituximab (Anti-CD20): Es un anticuerpo monoclonal quimérico murino humano, que se une al receptor de superficie CD20 de los linfocitos B, induciendo una lisis de los mismos probablemente mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y citotoxicidad dependiente de complemento. Es una terapia adyuvante válida para los

enfermos refractarios a inmunosupresores a dosis de 375 mg/m² por vía intravenosa cada semana durante 4 semanas. Los efectos secundarios más comunes se relacionan con la infusión; sin embargo, cuando menos cuatro pacientes han sufrido infecciones graves con este régimen. Ahmed y colaboradores reportaron la efectividad de la combinación de rituximab inmunoglobulinas en sujetos con inadecuada respuesta al tratamiento convencional, con remisión hasta por 22 a 37 meses.^{65,66,67,68}

Etanercept: Recientes estudios hallaron asociaciones entre la adhesión de queratinocitos y la producción de citocinas, entre ellos el FNT. Los niveles incrementados de FNT alfa e IL -6 se correlacionan con la actividad de la enfermedad y títulos altos de anticuerpos. El etanercept es una proteína humana dimérica, constituida por el receptor P75 del TNF y la porción Fc de la Ig G1 humana, con capacidad de ligarse al TNF libre y de la membrana de las células, inactivándolo y convirtiéndolo en una molécula biológicamente inactiva. Se ha realizado varios estudios aplicando Etanercept 50 mg a la semana contra placebo durante 16 semanas, observado adecuada respuesta, sin embargo el número de la muestra es pequeño para llegar a conclusiones. Sugieren que dosis más altas de etanercept (50 mg 2 veces por semana) podría conferir mayor efectividad. Se reporta un caso con pénfigo vulgar recalcitrante sin respuesta a tratamiento con otros inmunosupresores, al que se le administra etanercept (25 mg, 2 veces por semana) en combinación con prednisona 30 mg al día y azatioprina 100 mg al día, las lesiones mostraron mejoría a las 3 semanas de tratamiento. A la semana 16 se encontraba sin lesiones, logrando reducción y posterior eliminación de otros inmunosupresores, manteniéndose así durante 2 años. El etanercept es bien tolerado, hallando como efectos adversos reacción local a la inyección en los primeros 3 a 5 días en el 37%, infecciones de vías respiratorias en 35%, cefalea 20% y exantema en 10%, también se reportaron desordenes desmielinizantes del sistema nervioso central, sepsis, anemia aplásica, pancitopenia y lupus like.⁶⁹

Adalimumab: Es el primer anticuerpo monoclonal de origen completamente humano que se dirige específicamente contra el TNF- α . Su mecanismo de obtención se basa en la tecnología de presentación de péptidos y proteínas en fagos filamentosos. Se ha reportado casos en los que se presenta una adecuada respuesta administrando adalimumab, en uno de ellos se aplican 40 mg subcutáneos cada semana y mofetil micofenolato 1 gr al diario, después de la tercer dosis de adalimumab, se observó mejoría clínica importante.^{70,71}

Ustekinumab: Es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano, que se une a la subunidad p40 de la IL-12/IL-23, previniendo su unión con al receptor IL-12B1 de superficie de células T. Inhibe la IL-12 e IL-23, de este modo disminuye la presencia de citocinas proinflamatorias como (IL-2, TNF α , IFN γ). Se reporta un caso con diagnóstico de pénfigo vulgar sin respuesta a tratamiento con inmunosupresores, por lo que se le administra Ustekinumab 45 mg subcutáneos, siendo bien tolerado sin efectos adversos. Un mes después se valora observando bien resultado clínico, con más del 30% de superficie cutánea afectada ya reepitelizada, signo de Nikolsky negativo. Sin presentar disminución de la Dsg3 ni IL-10, pero con disminución de IL-12, IL-17, IFN- γ , e IL-6. Se incrementa la dosis a 90 mg SC, presentando de nuevo ampollas, los niveles de Dsg3 e IL-10 permanecieron elevados. Un mes después se observó recaída clínica, así como elevación de Dsg3 and IL-10. Por lo que se asume una falta de eficacia del ustekinumab en el pénfigo.⁷²

Infliximab: Es un anticuerpo monoclonal quimérico compuesto de una fracción humana de IgG1 (75%) y otra murina (25%), que se une y neutraliza al TNF, logrando interrumpir la cascada secuencial de activación de las vías inflamatorias mediadas por esta citocina, pero no a la linfotoxina (TNF). Se han encontrado niveles elevados de FNTa e IL-6 tanto sérico como en contenido de las ampollas, lo cual está asociado a la patogenia de la enfermedad, y es proporcional a la severidad clínica. Se han reportado casos de pénfigo vulgar severo refractario a múltiples tratamientos, a los que se les ha administrado infliximab a dosis de 5 mg /kg/día a la semana 0, 2 y 6, después cada 8 semanas; en un caso a las 48 horas de administración de infliximab, se detuvo la aparición de nuevas ampollas, y a los 7 días las preexistentes empezaron a desaparecer, después de 4 meses la enfermedad presentó remisión. Otro caso presentó mejoría a partir de la quinta infusión, con total remisión de las lesiones a la semana 22. A las 38 semanas se tomaron niveles circulantes de anticuerpos, los cuales disminuyeron de 1:640 a 1:160. Sin presentar efectos adversos. Sin embargo a partir de la décimo tercera infusión paciente presentó de nuevo lesiones. En algunos reportes se recomienda continuar con prednisona, leflunamida o metotrexate, como tratamiento adyuvante y para prevenir formación de anticuerpos anti quiméricos. Se deben tomar en cuenta algunos efectos adversos como infecciones bacterianas, virales y reactivación de tuberculosis.⁶⁵

Dapsona: Inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y está indicada como terapia coadyuvante (nivel de recomendación C). La dosis es de 50 a 200 mg al día. Administrada junto con corticoesteroides o agentes inmunosupresores induce tasas de remisión de incluso 81%. Entre sus efectos secundarios se encuentra la hemólisis por metahemoglobinemia.^{73,74}

Plasmaféresis: Su fundamento es eliminar los autoanticuerpos responsables de la enfermedad, pero muchas veces la plasmaféresis es seguida de un fenómeno de rebote que se explica por la redistribución de los anticuerpos desde el espacio extravascular y/o una síntesis mayor de éstos. Por ello, tiende a utilizarse junto con inmunosupresores con mejores resultados (nivel de recomendación C). Las indicaciones serían en enfermos controlados con dosis inaceptablemente elevadas de esteroides, aquellos que no se controlan o en los cuales no es posible descender la dosis de esteroides. Sin embargo, este tratamiento, elimina tanto autoanticuerpos, como inmunoglobulinas, albúmina y factores de la coagulación. Las complicaciones más frecuentes son escalofríos, reacciones alérgicas, fiebre e hipotensión. Muy rara vez edema pulmonar, y diátesis hemorrágica por déficit de plaquetas y de factores de coagulación, infecciones, alteraciones hidroelectrolíticas. Mediante el procedimiento de la inmunoadsorción extracorpórea se extraen distintos componentes del plasma con menores complicaciones.⁵⁵

Fotoféresis extracorpórea: Consiste en la extracción de productos del plasma eliminando autoanticuerpos de manera más selectiva que la plasmaféresis. Está indicada en pénfigo resistente en los que falla la terapia convencional (nivel de recomendación B). Su efecto secundario más frecuente es la hipovolemia.⁵⁵

Inmunoglobulinas intravenosas: Están indicadas como tratamiento coadyuvante de mantenimiento, seguro y efectivo, para casos resistentes en los que haya fallado otro método, así como para la inducción de remisión en las formas severas (nivel de recomendación B). Su mecanismo de acción consiste en que el organismo detecta un exceso de inmunoglobulinas e inicia un proceso catabólico de éstas, haciendo desaparecer los autoanticuerpos patogénicos. Se utiliza a dosis de 2 g/kg/mes dividido en 5 dosis de 0,4 g/kg con la que se obtienen respuesta en semanas permitiendo la reducción de otros tratamientos. La remisión clínica puede ser mantenida con la administración periódica de gammaglobulinas, las cuales bloquean los receptores Fc de las células reticuloendoteliales. En enfermos cardiacos pueden desencadenar una

insuficiencia cardiaca e hipertensión y se han descrito casos de insuficiencia renal. Sus principales efectos secundarios son: escalofríos, taquicardia, hipertensión, mialgias y náuseas durante la infusión.^{55,56}

Otros fármacos: Se han administrado sulfasalazina y pentoxifilina como coadyuvantes, ya que disminuyen las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral alfa, obteniendo una rápida mejoría clínica.⁷⁴ En la actualidad, se están estudiando fármacos colinomiméticos (piridostigmina y carbacol) que actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa y son agonistas indirectos de acetilcolina, debido a sus efectos antiacantolíticos.⁵⁴ La terapia con sales de oro se considera ineficaz en 15 a 28% de los pacientes, y se ha reportado que en 17 a 35% de ellos los efectos secundarios son suficientes para interrumpir el tratamiento.⁵⁵

Pronóstico: El curso de la enfermedad se rige por recaídas y exacerbaciones. Existen cuatro posibles patrones de remisión: 1) respuesta rápida con remisión completa y permanente (17% de los casos); 2) respuesta lenta con remisiones parciales e intermitentes y recaídas de menor intensidad a las del cuadro inicial (37%); 3) respuesta intermitente (35%) y 4) resistencia al tratamiento (10%).^{1,3}

Mortalidad: La mortalidad, antes del advenimiento de los corticoesteroides era casi de 100%, pero hoy en día, varía de 5 a 15%, dependiendo del tipo clínico (menor mortalidad en el pénfigo con predominio en las mucosas) y las complicaciones, las cuales generalmente se relacionan con septicemia por *S. aureus*.^{1,9}

PARTE II. DESARROLLO DEL PROYECTO.

Planteamiento y Justificación del Problema

Justificación.

1.- En estudios previos se ha propuesto el papel preponderante de la inmunidad celular y humoral en el desarrollo del pénfigo vulgar. Existen escasos estudios que muestran el papel de la expresión del gen *CTLA4* en la patogenia del pénfigo foliáceo; no obstante, en la literatura no se encuentran estudios que evalúen la existencia de alelos en el gen *CTLA4* en pacientes con pénfigo vulgar.

2.- El presente estudio pretende determinar la existencia de un genotipo de susceptibilidad en pacientes con pénfigo vulgar.

Pregunta de investigación.

1.- ¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos del gen *CTLA4* en pacientes con pénfigo vulgar?

Objetivos.

General.

1. Determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen *CTLA-4* (rs12990970, rs231775, rs3087243) en el pénfigo vulgar.

Particulares.

1. Producir una genoteca de muestras de pacientes con el diagnóstico de pénfigo vulgar e individuos control de la población mexicana mestiza.
2. Determinar la frecuencia alélica y genotípica de algunos de los sitios polimórficos presentes en el gen que codifica para la proteína *CTLA4* en un grupo de pacientes mexicanos con pénfigo vulgar.

Hipótesis.

1.- Si la frecuencia de polimorfismos de CTLA4 es elevada en pacientes con pénfigo vulgar, entonces podremos determinar la influencia de dichos polimorfismos en el desarrollo de pénfigo vulgar.

Metodología.

Diseño del estudio.

1.- Serie de Casos

Criterios de inclusión.

1. Pacientes que durante el estudio o en fechas pasadas el paciente haya sido diagnosticado con pénfigo vulgar confirmado por criterios clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos.
2. Población mestiza mexicana (sujeto nacido en México, con padres y abuelos mexicanos).

Criterios de no inclusión.

1. Pacientes con 1-2 criterios de diagnóstico de la enfermedad.

Variables.

Variables principales.

1. Distribución alélica: Nominal (homocigoto silvestre, heterocigoto, homocigoto mutado).
2. Distribución genotípica: Nominal (AA, AG, GG, AT, TT).

Variables secundarias.

1. Tiempo de evolución de la enfermedad: Cuantitativa discreta (meses).
2. Edad: Continua (en años).
3. Sexo: Nominal (femenino, masculino)

Población estudiada.

Los pacientes con pénfigo vulgar fueron reclutados de la consulta externa de Dermatología del Hospital General de México. Todos los sujetos fueron de raza

mestiza mexicana. Un mexicano mestizo es una persona que nació en México y es descendiente de ancestros de razas mezcladas a partir de los indígenas de esta región con las personas de Europa (principalmente España) y de África que migraron a América durante el siglo 16. Todos los casos fueron diagnosticados por expertos del servicio mencionado (Ver Criterios de selección). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de México.

Tamaño de la Muestra.

Se estima que la proporción esperada de polimorfismos de CTLA-4 en la población candidata a ser incluida es del 30% ($P_1 = 0.30$).

El incremento mínimo del riesgo que se requiere detectar es de 3 ($OR = 3$). El riesgo α es de 0.05 (bilateral) y el riesgo beta es de 0.10 (potencia $1 - \beta = 0.90$).

El número de sujetos necesarios para estimar un OR es de 43. Se llevará a cabo un método de muestreo no probabilístico, de casos consecutivos que cumplieron con los criterios de selección, hasta alcanzar el tamaño de la muestra.

Genotipificación del Gen CTLA4.

1. La genotipificación de *CTLA4* se realizó a partir de una muestra de ADN que se aislará del paquete leucocitario de una muestra de sangre periférica obtenida por punción venosa.
2. El volumen de sangre que se obtuvo fue de 5mL, el cual se depositó en tubo con EDTA (tubo de biometría hemática). La muestra de sangre periférica se identificó con las iniciales y/o clave del paciente, número de expediente y diagnóstico.
3. Se diseñaron los oligonucleótidos con la secuencia correspondiente a la región de interés de acuerdo a las características del fabricante.
4. Se amplificó la muestra mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
5. La genotipificación se llevó a cabo mediante la tecnología de Hi-Res Melting® (HRM) y secuenciación automatizada.

Procedimiento:

1. Se tomaron muestras de sangre periférica de pacientes con pénfigo vulgar posteriormente se extrajo DNA según la técnica descrita en el apartado se visualizó la cantidad de DNA por electroforesis, los

fragmentos de PCR fueron purificados por elusión de muestras por Qiaex II, posteriormente se llevó a cabo la reacción de secuenciación y se purificaron los productos de extensión del Gen CTLA-4, se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la reacción codificante del gen para análisis por *High Resolution Melting*.

A partir de muestras de sangre venosa anticoaguladas con EDTA se procedió a la extracción de ADN utilizando el método salino como sigue:

Se obtuvo el paquete leucocitario mediante centrifugación (3,000 rpm x 5 min), inmediatamente se les agregó una solución de TTS (Tris-Tritón-Sacarosa; Tris 0.01M, Tritón 1%, Sacarosa 0.3M), se agitó y se sometió a centrifugación durante 2 min a 10,000 r.p.m.; se desechó el sobrenadante y se repitió el procedimiento 3 veces. Al botón celular se adicionó 570µL de NaCl 5mM, se agitó durante dos minutos, posteriormente se le añadieron 30µL de SDS al 10% y se procedió a agitar cinco minutos, finalmente se agregaron 200µL de NaCl concentrada y se agitó durante diez minutos.

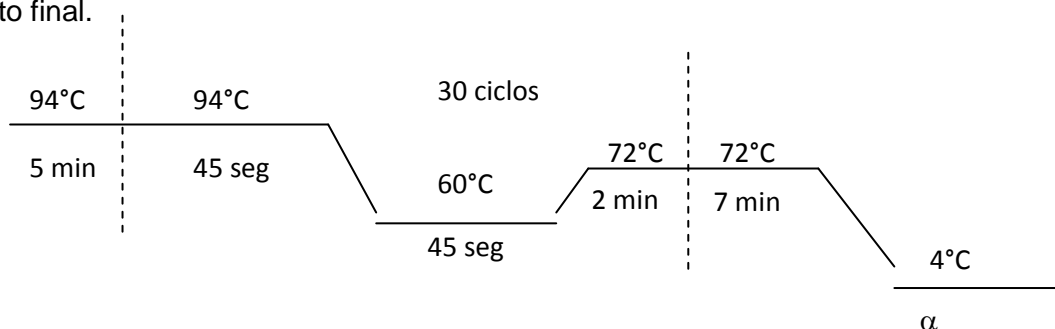
Posteriormente se sometieron a centrifugación durante veinte minutos a 11,000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante en un tubo estéril y se le adicionaron 2 ml de etanol al 100%. El ADN obtenido se lavó con etanol al 70% e inmediatamente se re-suspendió en 200 µl de agua inyectable y se congeló a 4°C.

Cuantificación de ADN.

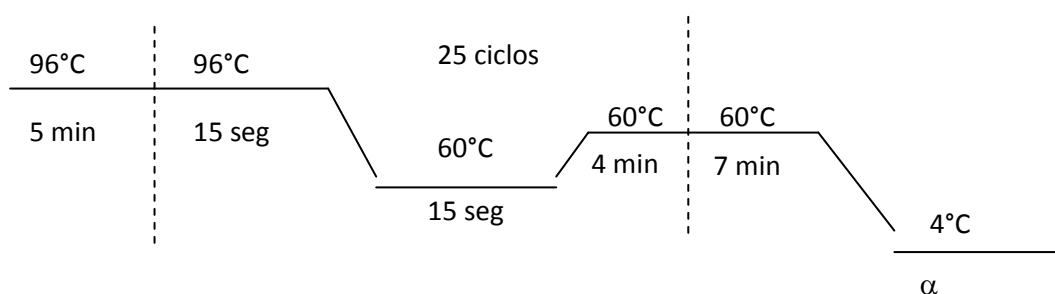
La cuantificación de ADN se realizó mediante espectrofotometría, utilizándose una celda de cuarzo de 1mL y el espectrofotómetro JENWAY 6305. Cada una de las muestras se agitó durante 30 segundos, se tomaron 5µL de volumen y se diluyeron en 995 µL de agua inyectable, posteriormente cada una de las diluciones se agitó durante 30 segundos y se procedió a la lectura en el espectrofotómetro, a 260nm con un factor de dilución igual a 200. A la par se validó la calidad de ADN con la relación 260/280 obteniéndose valores de 1.7-1.9. Así mismo se corroboró ADN de alto peso molecular al correr una electroforesis de agarosa al 1%, con un voltaje de 80, obteniéndose ADN no fragmentado y de alto peso.

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

Se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes blastando para evitar productos inespecíficos. Para los cuales se estandarizaron las siguientes condiciones de PCR de punto final.



Para confirmar el 100% de homología se sometieron controles sanos a secuenciar bajo las siguientes condiciones, utilizando Big Dye v 3.1 en un secuenciador ABI 310



Confirmada la secuencia las muestras de pacientes se sometieron a *screening* del SNP utilizando la tecnología de High Resolution Melting (HGM) utilizando las siguientes condiciones:

Componente	Volumen para una reacción (μL)
H ₂ O (LightScanner Reagent Grade Water Idaho Technology Inc.)	3,44
LC Green TM Plus + Gene Scanning Reagent 10X Solution (Bio Chem)	1
Buffer Mix (BioTecMol)	1
dNTPs (PROMEGA)	1
Oligonucleótido Sentido	0,5
Oligonucleótido Antisentido	0,5
Taq (Amplificasa BioTecMol)	0,06
ADN	2 (0.1ng de ADN)
MgCl ₂ [30mM] (BioTecMol)	0,5

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se colocaron en los capilares LightCycler® Capillaries (Roche) de 20µL de capacidad, diseñados específicamente para el equipo LightScanner® 32 System. Utilizando el siguiente programa de ciclaje:

Análisis estadístico.

Las frecuencias de alelos y el genotipo de los polimorfismos estudiados en pacientes se obtuvieron por conteo directo.

Recursos.

Los recursos (el material de obtención de la muestra de sangre como jeringas, tubos de Vacutainer, y resto de material para toma de muestra de sangre, papelería necesaria para las hojas de colección de datos, lápices y plumas), fué financiado por el Investigador responsable. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el servicio de Genética.

Aspectos Éticos y de Bioseguridad.

Se garantizó la autonomía del paciente solicitando la firma de una carta de consentimiento, así como la confidencialidad de los datos obtenidos y su derecho a no participar en el estudio sin que esto redunde en la calidad de su atención. La investigación se clasificó como de riesgo mínimo. La venopunción se efectuó con técnica de asepsia para evitar contaminación e infecciones. El proyecto se sometió a consideración del Comité de Investigación y Ética del Hospital General de México.

Las muestras de sangre fueron tomadas con material subsidiado por los investigadores garantizando su uso una sola vez, asegurando además la correcta eliminación del material punzocortante de acuerdo a las normas de higiene en salud

PROGRAMA	PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	ADQUISICIÓN	CICLOS
DESNATURALIZACIÓN	INICIAL	95	1 min.	-	1
AMPLIFICACIÓN	DESNATURALIZACIÓN	95	5 seg	CUANTIFICACIÓN	50
	ALINEAMIENTO	61	17 seg		
	ELONGACIÓN	72	30 seg	SENCILLO	
PRE-HRM	1	95	5 seg	-	1
	2	40	30 seg		
HRM	TEMPERATURA 1	50	PREDE-TERMINADO	HIGH-RES MELT	1

vigentes. Se adjunta la carta de consentimiento informado, que contendrá los propósitos y objetivos de la investigación, los beneficios y posibles molestias e inconvenientes de la participación del paciente y sus familiares, así como también el derecho de retirarse en cualquier momento y por cualquier motivo de la investigación, sin verse perjudicada su atención médica.

Relevancias y expectativas.

1.- De este trabajo se espera surjan las bases para la realización de futuros proyectos ya que si se determina la frecuencia de polimorfismos en el gen CTLA-4 en pacientes mexicanos con diagnóstico de Pénfigo Vulgar se podrán mejorar los blancos terapéuticos.

Resultados.

Se estudiaron 44 casos con diagnóstico clínico-histopatológico/inmunológico de pénfigo vulgar, de estos, 25 (56.8%) eran del sexo masculino y 19 (43.2%) del sexo femenino. La edad promedio y la desviación estándar de los pacientes fue de 46 ± 11 años. Las comorbilidades más importantes fueron cardiovasculares (7 casos de hipertensión arterial sistémica, 2 de cardiopatía isquémica, 1 de hipertensión arterial pulmonar), endocrinológicas y metabólicas (6 con obesidad, 5 con diabetes mellitus, 4 con distiroidismo y 4 con síndrome metabólico), neurológicas y psiquiátricas (4 con depresión mayor o distimia, 1 con epilepsia y 2 con migraña).

Todos los pacientes se encontraban en tratamiento con prednisona en dosis variable en relación a la severidad del caso y la fase clínica de la enfermedad. De la muestra, 23 pacientes se encontraban utilizando dapsona como adyuvante principal, 15 azatioprina y 6 metotrexate. Dado que la mayor parte de los casos se encontraban en fase de control (15) o consolidación (24), y solo 5 en actividad, no se correlacionaron los polimorfismos con la superficie corporal afectada.

Se realizó para cada uno de los SNP's la técnica HRM, las líneas en gris representan a los individuos silvestres, el resto de líneas en diferentes colores identifican pacientes con "irregularidades alélicas", que posteriormente se llevaron a secuenciar. Las diferencias colorimétricas, se basan en los diferentes puntos de temperatura en los cuales las cadenas de DNA se desnaturalizaron. **(Fig.1,4,7)**

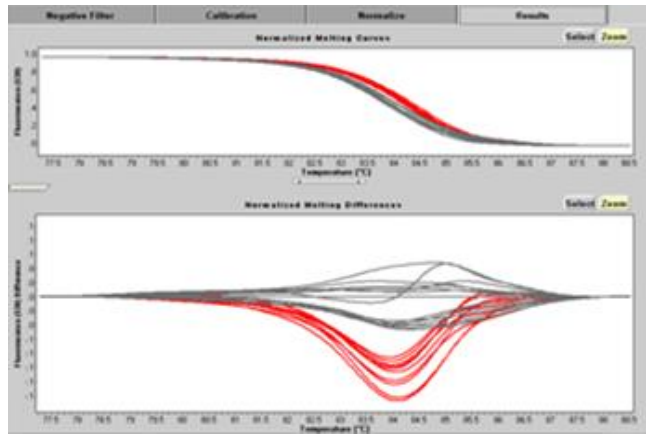


Fig.1 HRM de rs12990970

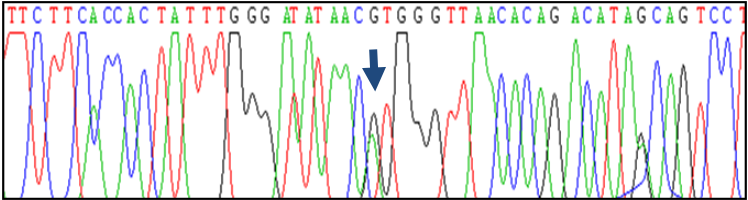


Fig.2 Gráfica de secuenciación WallTime de rs12990970

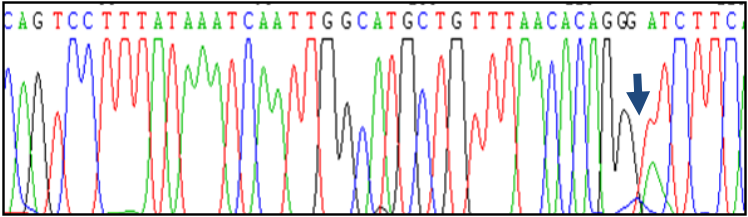


Fig.3 Gráfica de secuenciación indicativa de homocigidad rs12990970

La (Fig.2) indica que el WallTime de rs12990970 es “G”, mientras que la (Fig.3) ilustra homocigidad para “A” y “G”.

Gráfica HRM para rs231775 (Fig.4), las líneas en gris representan a los pacientes silvestres. El resto de las líneas con otros colores representan “irregularidades alélicas”.

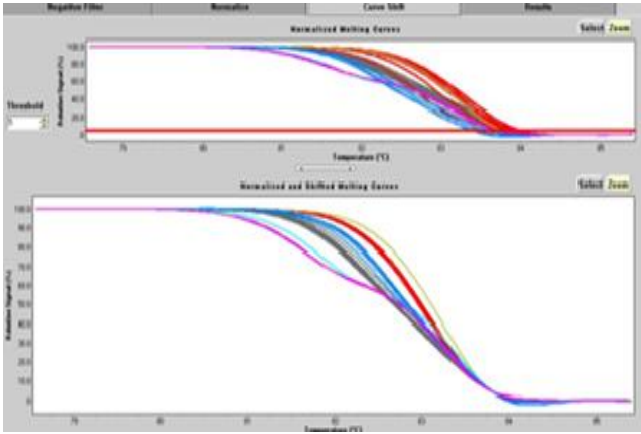


Fig.4 HRM de rs rs231775

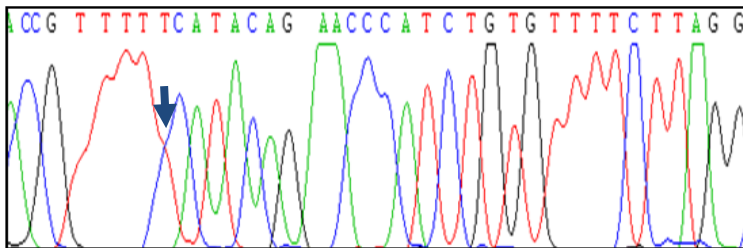
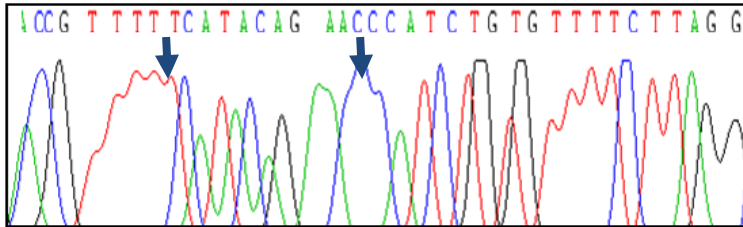


Fig.5 Gráfica de secuenciación WallTime de rs231775

Fig.6 Gráfica indicativa de heterocigocidad para CT en rs231775

La (**Fig.5**) indica que el WallTime de rs231775 es “C”, también se aprecia un punto de homocigocidad en “T”. La (**Fig.6**) indica pacientes heterocigotos para “CT”.

Gráfica HRM para rs3087243 (**Fig.7**).

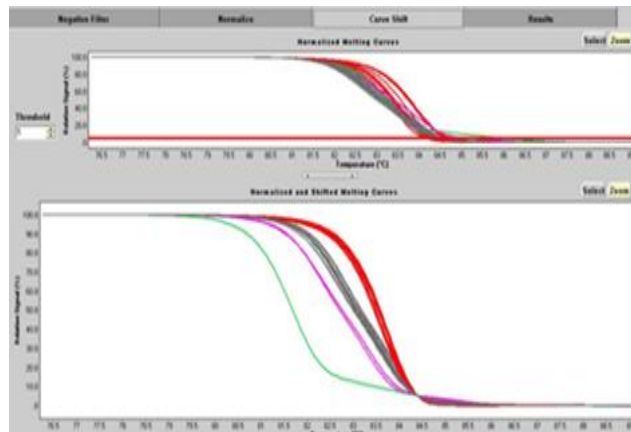


Fig.7 HRM de rs rs3087243

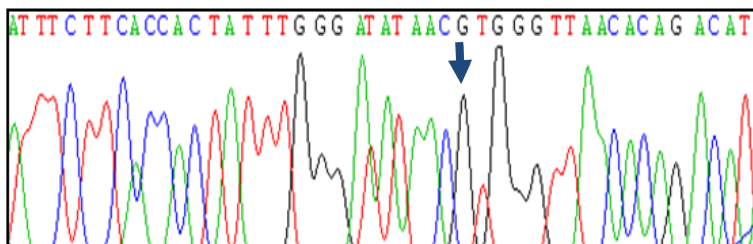


Fig.8 Gráfica de secuenciación WallTime de rs3087243

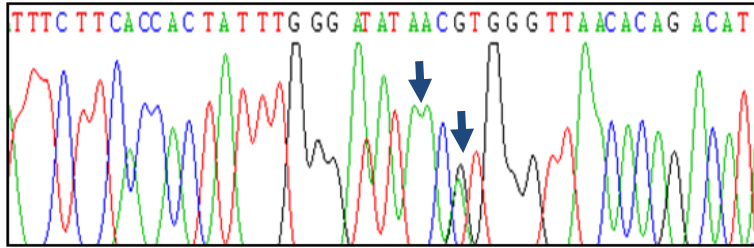


Fig.9 Gráfica indicativa de heterocigocidad en GA y homocigocidad AA en rs3087243

La **(Fig.8)**, indica que el WallTime es “G”. La **(Fig.9)**, representa heterocigocidad para los alelos “GA” y homocigocidad en alelos “AA”, para rs3087243.

Se encontraron los siguientes resultados en la distribución genotípica: Para rs12990970, fueron 10 pacientes homocitogos (4 femeninos) y (6 masculinos), 34 pacientes silvestres (13 femeninos) y (21 masculinos) lo anterior representa: 68% de pacientes silvestres y 20% de pacientes homocigotos. **(Tablas 1, 2) y (Gráfico 1)**

rs12990970	Distribución genotípica
Homocigoto	10
Muestra no viable	6
Silvestre	34
Total general	50

Tabla 1. Distribución genotípica rs12990970

Distribución genotípica	rs12990970		
	Femenino	Masculino	Total general
Homocigoto	4	6	10
Muestra no viable	5	1	6
Silvestre	13	21	34
Total general	22	28	50

Tabla 2. Distribución genotípica por sexo rs12990970

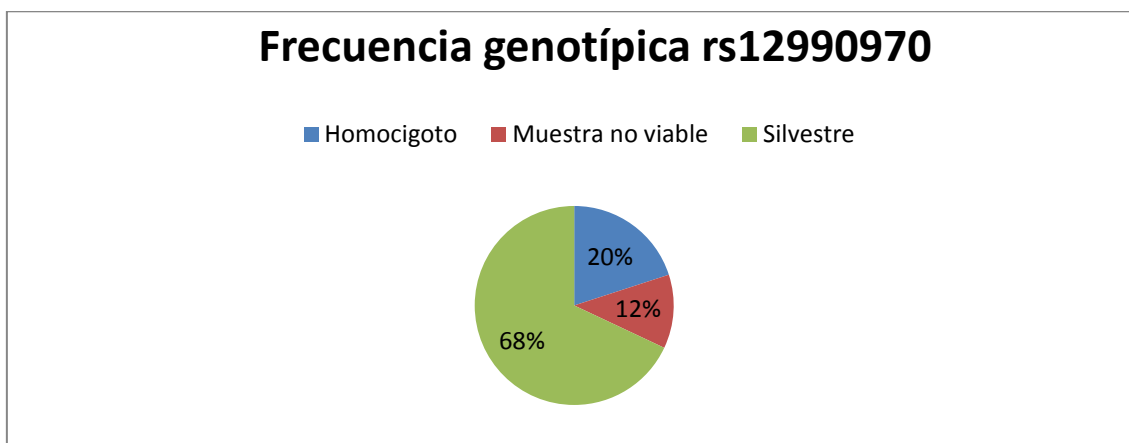


Gráfico 1. Porcentajes de frecuencia genotípica rs12990970

Para rs231775: Se detectaron 5 pacientes heterocigotos (5 masculinos), 13 homocigotos (8 femeninos) y (5 masculinos), 26 pacientes silvestres (9 femeninos) y (17 masculinos), lo que representa: 52% de pacientes silvestres, 26% de homocigotos y 10% heterocigotos. **(Tablas 3,4) y (Gráfico 2)**

rs231775	Distribución genotípica
Heterocigoto	5
Homocigoto	13
Muestra no viable	6
Silvestre	26
Total general	50

Tabla 3. Distribución genotípica rs231775

Distribución genotípica	rs231775		
	Femenino	Masculino	Total general
Heterocigoto		5	5
Homocigoto	8	5	13
Muestra no viable	5	1	6
Silvestre	9	17	26
Total general	22	28	50

Tabla 4. Distribución genotípica por sexo rs231175

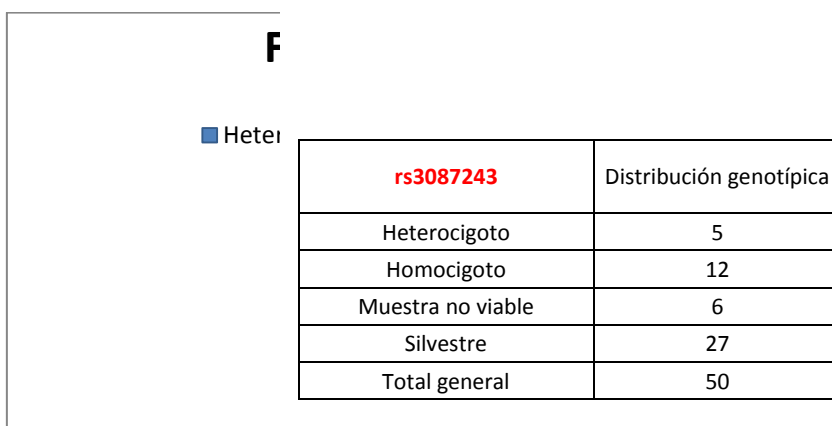


Gráfico 2. Porcentajes de frecuencia genotípica rs231775

Para rs3087243: Se detectaron 5 pacientes heterocigotos (3 femeninos) y (2 masculinos), 12 pacientes homocigotos (4 femeninos) y (8 masculinos), 27 pacientes silvestres (10 femeninos) y (17 masculinos), lo que representa: 54% de pacientes silvestres, 24% de homocigotos y 10% heterocigotos. **(Tablas 5,6) y (Gráfico 3)**

Tabla 5. Distribución genotípica rs3087243

Distribución genotípica	rs3087243		
	Femenino	Masculino	Total general
Heterocigoto	3	2	5
Homocigoto	4	8	12
Muestra no viable	5	1	6
Silvestre	10	17	27
Total general	22	28	50

Tabla 6. Distribución genotípica por sexo rs3087243

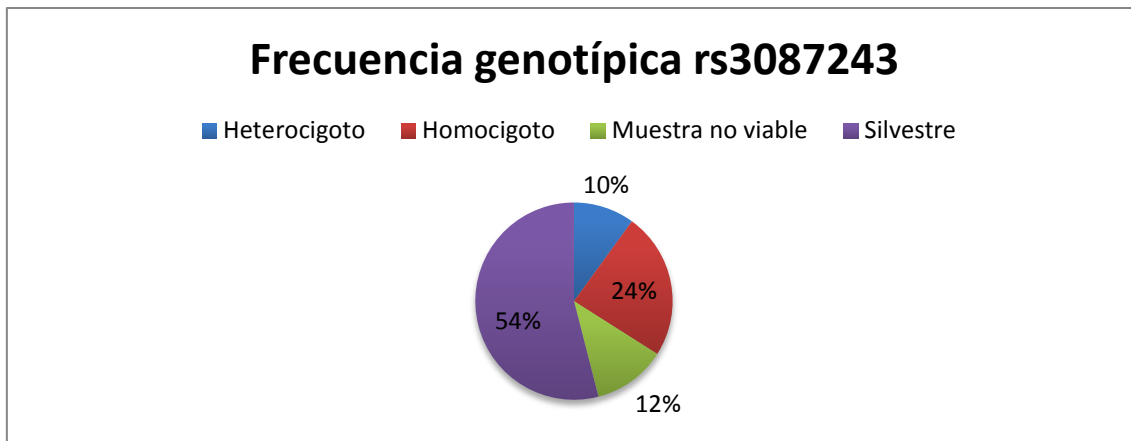


Gráfico 3. Porcentajes de frecuencia genotípica rs3087243

En cuanto a las frecuencias alélicas, para rs12990970 fueron 6 pacientes homocigotos (AA-14%) y 4 homocigotos para (GG-9%). Silvestres 34 pacientes (GA-77%). **(Tabla 7) y (Gráfico 4)**

rs12990970					
Distribución Alélica	AA	GA	GG	Muestra no viable	Total general
Homocigoto	6		4		10
Muestra no viable				6	6
Silvestre		34			34
Total general	6	34	4	6	50

Tabla 7. Distribución alélica rs12990970

Frecuencia Alélica rs12990970

■ Homocigoto AA ■ Homocigoto GG ■ Silvestre GA

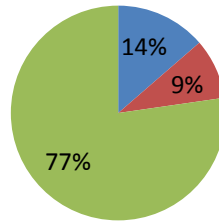


Gráfico 4. Porcentajes de frecuencias alélicas rs12990970

Para rs231775: Fueron 5 pacientes heterocigotos (CT-11%), 13 homocigotos (TT-30%) y 26 pacientes silvestres (CC-59%). **(Tabla 8) y (Gráfico 5)**

rs231775					
Distribución Alelica	CC	CT	TT	Muestra no viable	Total general
Heterocigoto		5			5
Homocigoto			13		13
Muestra no viable				6	6
Silvestre	26				26
Total general	26	5	13	6	50

Tabla 8. Distribución alélica rs231775

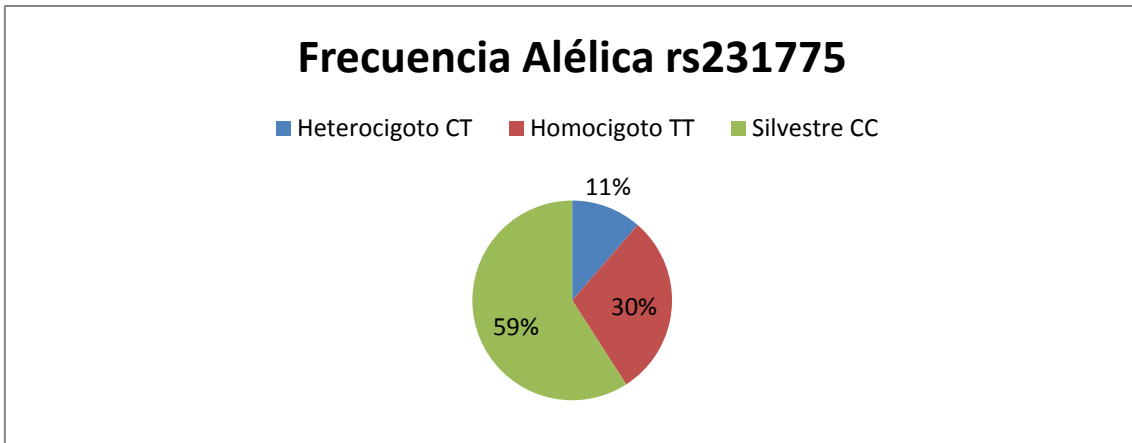


Gráfico 5. Porcentajes de frecuencias alélicas rs231775

Para rs3087243: Fueron 5 pacientes heterocigotos (GA-11%), 12 homocigotos (AA-27%) y 27 pacientes silvestres (GG-62%).(Tabla 9) y (Gráfico 6)

rs3087243					
Distribución Alélica	AA	GA	GG	Muestra no viable	Total general
Heterocigoto		5			5
Homocigoto	12				12
Muestra no viable				6	6
Silvestre			27		27
Total general	12	5	27	6	50

Tabla 9. Distribución alélica rs3087243

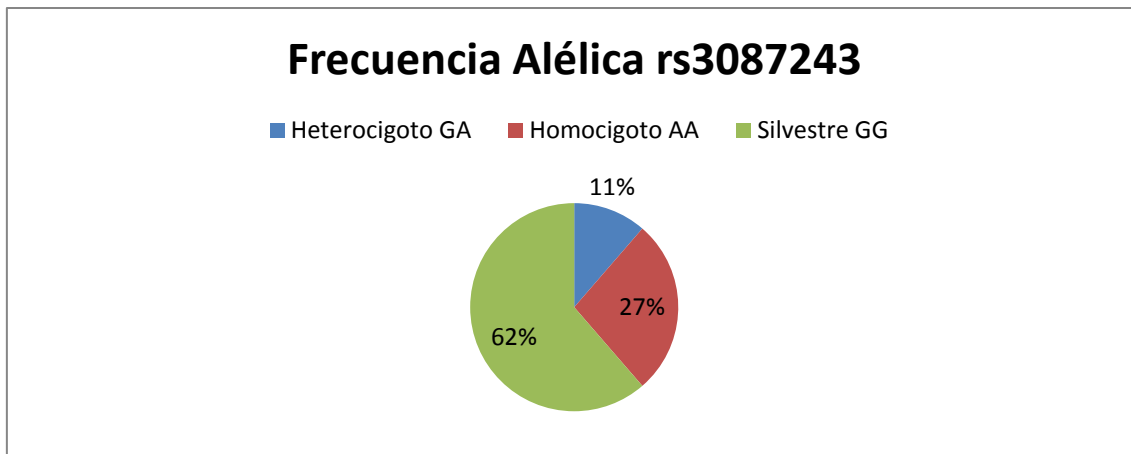


Gráfico 6. Porcentajes de frecuencias alélicas rs3087243

Discusión.

Cada individuo posee una base genética que le confiere susceptibilidad o protección ante ciertas enfermedades, actualmente, se sabe que las enfermedades autoinmunes dependen de múltiples genes, que se encuentran dentro y fuera del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).⁵

La dificultad en identificar los genes de susceptibilidad se debe, en parte, a la naturaleza inherente de estas complejas enfermedades poligénicas y a las diferencias en composiciones génicas de las poblaciones humanas, sin embargo, la importancia de la molécula CTLA-4 en la modulación de la respuesta inmune, ha sido evidenciada

por los innumerables estudios realizados desde hace varios años con el fin de establecer su relación con patologías de origen autoinmune.^{27,34}

CTLA-4 se expresa en células T CD4 y CD8 activadas, en niveles 10 a 100 veces menores que los correspondientes a CD28, alcanza una expresión máxima a las 48-72 horas después de la activación de las células T.³⁴

Aunque inicialmente se le atribuyó un papel semejante al CD28 en la activación de las células T, los hallazgos experimentales más recientes le adjudican un papel regulador negativo.²⁷ De hecho, la tendencia de los ratones *knock out* para CTLA-4 a desarrollar enfermedades autoinmunes soportan esta noción.²⁹

El mecanismo responsable de la función de CTLA-4 parece estar relacionado con la asociación de esta molécula a la fosfatasa SHP2, a la competencia por moléculas intracelulares como PI3K y a la inhibición de la unión del CD28 con sus ligandos, al poseer mayor afinidad por éstos. Existen relaciones coordinadas entre la expresión y función de CD28 y CTLA-4; se ha visto que la presencia en la membrana y el estímulo de CD28 son esenciales para la expresión máxima y la regulación eficiente del RNA mensajero de CTLA-4. Asimismo, los antagonistas de CD28 bloquean la modulación positiva de CTLA-4 en respuesta a los antígenos.²⁷

Las mutaciones que alteran la función ó expresión de CLTA-4, pueden producir una activación exagerada de las células T.³¹ Lo anterior es clave para confirmar que CLTA-4 es fundamental en la homeostasis inmunológica, ejerciendo una función reguladora negativa en los linfocitos T ,ya que envía señales de transcripción para IL-2 e inhibe a la molécula CD28, por lo que debe ser considerado como un blanco para desarrollo de inmunoterapia.^{34,38}

El gen CTLA-4, contiene 4 exones y se han descrito varios polimorfismos en la región promotora. La sustitución de una G por A, en la posición 49 del exón 1 (49 A/G), causa un cambio de treonina por alanina en el codón 17, por lo que la presencia de este alelo, ha sido asociada al desarrollo de autoinmunidad.³⁸

Ejemplos de enfermedades con polimorfismo 49 en el alelo G, son: Pacientes con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso, dermatitis atópica y asma.^{31,38} Alopecia areata es otro ejemplo, en donde la patogénesis está marcada por polimorfismos en el gen CTLA-4 se evidenció que el polimorfismo rs3087243 se encontraba en pacientes con casos severos, rs231775 y rs3087243 también se presentaban en pacientes de difícil respuesta al manejo.⁴²

En el caso de pacientes con psoriasis y vitiligo, se han descubierto polimorfismos en los alelos CT.³⁴

En pénfigo vulgar la susceptibilidad genética está influida por proteínas específicas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, los estudios realizados *in vitro* han demostrado la necesaria colaboración entre los linfocitos T CD4 estimulados por la desmogleína 3 y las células B para inducir la producción de anticuerpos.^{5,7}

La proporción de células Th1/Th2 condiciona una respuesta inmunológica policlonal de anticuerpos IgG₁ e IgG₄ frente a fragmentos antigénicos del ectodominio de la desmogleína 3.^{13,14}

En este contexto nuestro estudio demostró los siguientes hallazgos: Para rs12990970, se encontró que el WallTime es “G”, con homocigocidad para “A” y “G”. En rs231775, el WallTime es “C”, con homocigocidad en “T” y heterocigocidad en “CT”. En rs3087243, el WallTime es G, con homocigocidad en “A” y heterocigocidad en “GA”.

Para los 3 polimorfismos, se encontró que la población estudiada en su mayor porcentaje son pacientes de genotipo silvestre. En (rs12990970), no se encontraron individuos heterocigotos, y fue en este polimorfismo donde se encontró la mayor cantidad de pacientes silvestres (77%). En el segundo (rs231775) y en el tercer polimorfismos (rs3087243) se detectaron 10 pacientes heterocigotos. En rs231775, se encontró la mayor cantidad de pacientes homocigotos (30%), para (TT). La heterocigocidad y homocigocidad predominan en el sexo masculino.

Este estudio es el primero en detectar polimorfismos del gen CTLA-4, en pacientes con pénfigo vulgar, lo cual es básico para formar una genoteca de pacientes mexicanos. La tecnología HRM empleada es rápida y eficiente para detectar las irregularidades alélicas.

Sin embargo dentro de las limitaciones, se encuentran que es un estudio meramente descriptivo, necesitamos comparar nuestro estudio con un grupo control para obtener resultados más sólidos, también será de utilidad comparar las respuestas al tratamiento en los pacientes homocigotos ó heterocigotos, para poder determinar un patrón de susceptibilidad ó predisposición genética.

Se espera que este trabajo, surjan otros como determinar la importancia de la expresión de CTLA-4 en la respuesta al tratamiento del pénfigo vulgar, con esquemas convencionales, así como el desarrollo de nueva inmunoterapia dirigida a este blanco molecular y de esta forma modificar el curso de la enfermedad, impactando en el número de recaídas, morbilidad y mortalidad en nuestra población.

Conclusiones

1. CTLA-4 es fundamental para mantener el equilibrio inmunológico.
2. Este es el primer estudio realizado en nuestro país para detectar polimorfismos en el gen CTLA-4 de pacientes con pénfigo vulgar.
- 3.- Estudio útil que ayuda a formar genoteca de pacientes con pénfigo vulgar.
4. La tecnología HRM, es la mayor utilidad para detectar pacientes “silvestres”, de aquellos con irregularidades alélicas.
5. En los 3 polimorfismos estudiados, la distribución genotípica que predominó fueron los pacientes “silvestres”.
6. Se requiere llevar a cabo un estudio con controles, para en un futuro correlacionar los hallazgos genotípicos y alélicos, con las respuestas al tratamiento de los pacientes.

Referencias

1. Sánchez-Pérez J, García-Diez A. Pénfigo. *Actas Dermosifiliogr* 2005;96:329-356.
2. Baroni A, Lanza A, Cirillo N, Brunetti G, et al. Vesicular and bullous disorders: Pemphigus. *Dermatol Clin* 2007;25:597-603.
3. Castellanos-Íñiguez A, Guevara- Gutiérrez E. Pénfigo vulgar. *Dermatol Rev Mex* 2011;55(2):73-83.
4. Guillen S, Khachemoune A. Pemphigus vulgaris: a short review for the practitioner. *Dermatol Nurs* 2007;19:269-272.
5. Animesh A., The Genetics of Pemphigus. *Dermatol Clin*. 2011;29:381–391

6. Scully C, Challacombe SJ. Pemphigus vulgaris: update on etiopathogenesis, oral manifestations, and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:397-408.
7. Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, et al. Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med*. 1993; 177:419-24.
8. Stanley JR. The pathophysiology of pemphigus. *J Dermatol Sci* 2000;24:155-157.
9. Tirado SA. Pénfigo vulgar. Estudio epidemiológico y análisis de posibles factores de riesgo de mortalidad. *Dermatología Rev Mex* 2006;50:50-53
10. Vega-Memije ME, Sáez de Ocariz-Gutiérrez MM, Cortés-Franco R, Domínguez-Soto L, Granados-Arriola J. Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. *Gac Med Mex* 2001;137:535-540.
11. Itsukaichi M. Twins with Neonatal Pemphigus Vulgaris Born to a Mother with Pemphigus Vulgaris: A Case Report. *Pediatr Dermatol*. 2012;4:212-216
12. Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Budinger L, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*. 2001;144:1183-8.
13. Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, et al. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. *Eur J Immunol*. 2002;32:627-33.
14. Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol*. 2003;170:635-42.
15. Hacker-Foegen MK, Fairley JA, Lin MS. T cell receptor gene usage in desmoglein-3-specific T lymphocytes from patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2003; 121:1365-72.
16. Stanley JR. Autoantibodies against adhesion molecules and structures in blistering skin diseases. *J Exp Med* 1995;181:1-4.
17. Bhol KC, Rojas AI, Khan IU, Ahmed AR. Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. *Cytokine*. 2000;12: 1076-83.

18. Kalayciyan A, Engin B, Serdaroglu S, Mat C, Aydemir EH, Kotogyan A. A retrospective analysis of patients with pemphigus vulgaris associated with pregnancy. *Br J Dermatol*. 2002;147:396-7.
19. Aghassi D, Dover JS. Pemphigus foliaceus induced by psoralen- UV-A. *Arch Dermatol*. 1998;134:1300-1.
20. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanation for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:461-8
21. Gallo R, Massone C, Parodi A, Guarrera M. Allergic contact dermatitis from thiurams with pemphigus-like autoantibodies. *Contact Dermatitis*. 2002;46:364-5.
22. Lin R, Ladd DJ Jr, Powell DJ, Way BV. Localized pemphigus foliaceus induced by topical imiquimod treatment. *Arch Dermatol*. 2004;140:889-90.
23. Krauze E, Wygledowska-Kania M, Kaminska-Budzinska G, Lis A, Brzezinska-Wcislo L. Radiotherapy induced pemphigus vulgaris. *Ann Dermatol Venereol*. 2003;130:549-50.
24. Grando SG. Is the keratinocyte cholinergic system altered in pemphigus?. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1993;2:67-71.
25. Hogan P. Pemphigus vulgaris following a cutaneous thermal burn. *Int J Dermatol*. 1992;31:46-9.
26. Tur E, Brenner S. Diet and pemphigus. In pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. *Arch Dermatol*. 1998;134:1406-10.
27. Scalapino KJ, Daikh DI. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2008;223:143-55.
28. Petukhova L. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. *Nature*. 2010;466(7302):113-7
29. Li X, Zhang C, Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *J Clin Immunol*. 2012 Jun;32(3):530-9.
30. Brenner S, Sasson A, Sharon O. Pemphigus and infections. *Clin Dermatol*. 2002;20:114-8.
31. Kimkong I, Nakkuntod J. Association between CTLA-4 polymorphisms and the susceptibility to systemic lupus erythematosus and Graves' disease in Thai population. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011 Sep;29(3):229-35.

32. Tufano MA, Baroni A, Buommino E, et al. Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol*. 1999;141:1033-9.
33. Uzun S, Durdu M. The specificity and sensitivity of Nikolsky sign in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:411-415.
34. Gough Stephen, Walker L “*CTLA4 Gene polymorphism and autoimmunity*” *Immunological Reviews* 2005;204:102-115
35. Muñoz-Valle JF. The +49A>G CTLA-4 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population. *Clin Chim Acta*. 2010 ;411(10):725-8.
36. Alfidhli S. Association of Hashimoto's thyroiditis with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) and inducible co-stimulator (ICOS) genes in a Kuwaiti population. *Endocrine*. 2012; 1-11
37. Pastuszek-Lewandoska D, Sewerynek E. CTLA-4 gene polymorphisms and their influence on predisposition to autoimmune thyroid diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). *Arch Med Sci*. 2012;8(3):415-21
38. Chang WW, Zhang L. Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Sep;39(9):9159-65.
39. Lee YH, Choi SJ. CTLA-4 and TNF- α promoter-308 A/G polymorphisms and ANCA-associated vasculitis susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):319-26.
40. Carr EJ, Niederer HA. Confirmation of the genetic association of CTLA4 and PTPN22 with ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet*. 2009;10:121.
41. Dwivedi M. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) in isolated vitiligo: a genotype-phenotype correlation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(4):737-40.
42. Pincerati MR, Dalla-Costa R, Petzl-Erler ML. CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genet Mol Biol*. 2010 Jul;33(3):442-4.
43. John KG. Genetic Variants in CTLA4 Are Strongly Associated with Alopecia Areata. *Journal of Investigative Dermatology* 2011; 131:1169–1172
44. Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, Tanikawa A, et al. Monitoring disease activity in pemphigus with enzymelinked immunosorbent assay using recombinant desmogleins1 and 3. *Br J Dermatol* 2002;147:261-265.

45. Murell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, et al. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:1043-1046.
46. Suárez-Fernández R, España-Alonso A, Herrero-Gonzalez JE, Mascaró-Galy JM. Manejo práctico de las enfermedades ampollas autoinmunes más frecuentes. *Actas Dermosifiliogr* 2008;99:441-455.
47. Mutasim DF. Management of autoimmune bullous diseases: Pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:859-877.
48. López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Treatment of pemphigus and pemphigoids. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:410-411.
49. Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazzhooh M. Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:622-628.
50. Pfütze M, Niedermeier A, Hertl M, Eming R. Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus. *Eur J Dermatol* 2007;17:4-11.
51. Luftl M, Stauber A, Mainka A, Klingel R, Schuler G, Hertl M. Successful removal of pathogenic autoantibodies in pemphigus by immunoabsorption with a tryptophan-linked polyvinylalcohol adsorber. *Br J Dermatol*. 2003;149:598-605.
52. Williams LC, Nesbitt LT. Update on systemic glucocorticosteroids in dermatology. *Dermatol Clin* 2001;19:63-77.
53. López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Treatment of pemphigus and pemphigoids. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:410-411.
54. Turner MS, Sutton D, Sauder DN. The use of plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43:1058-64.
55. Harman KE, Albert S, Black MM. Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2003;149:926-937.
56. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Hanada K, et al. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:595-603.
57. Patel AA, Swerlick RA, McCall CO. Azathioprine in dermatology: the past, the present and the future. *J Am Acad Dermatol* 2006;55:369-389.
58. Stern DK, Tripp JM, Ho VC, Lebwohl M. The use of systemic immune moderators in dermatology: An Update. *Dermatol Clin* 2005;23:259-300.

59. Beissert S, Werfel T, Frieling U, Böhm M, et al. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2006;142:1447-1454.
60. Orvis AK, Wesson SK, Breza TS, Church AA. Mycophenolate mofetil in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:183-199
61. Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2000;136:868-872
62. Shah N, Green AR, Elgart GW, Kerdel F. The use of chlorambucil with prednisone in the treatment of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:85-88.
63. Smith TJ, Bystryn JC. Methotrexate as an adjuvant treatment for pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1999;135:1275-1276.
64. Chen S, Lu X, Zhou G. Mild pemphigus foliaceus responding to combination therapy with niacinamide and tetracycline. *Int J Dermatol* 2003;42:981-982.
65. Graves JE, Nunley K, Heffernan MP. Off-label uses of biologics in dermatology: rituximab, omalizumab, infliximab, etanercept, adalimumab, efalizumab, and alefacept (Part 2 of 2). *J Am Acad Dermatol* 2007;56:55-79.
66. El-Tal AK, Posner MR, Spigelman Z, Ahmed AR. Rituximab: A monoclonal antibody to CD20 used in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2006;55:449-459.
67. Pitarch G, Sánchez-Carazo JL, Pardo J, Torrijos A, et al. Treatment of severe refractory pemphigus vulgaris with rituximab. *Actas Dermosifiliogr* 2006;97:221-222
68. Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner RM. Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2006;355:1772-1779.
69. Fiorentino D., A Pilot Study of Etanercept Treatment for Pemphigus Vulgaris. *Arch Dermatol*. 2010;147(1):117-118
70. Vojáčková N. Pemphigus vulgaris treated with adalimumab: case study. *Dermatol Ther*. 2012;25(1):95-7
71. Traczewski P. Adalimumab in dermatology. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66(5): 618–625
72. Tirado-Sánchez A. Th-17 and the lack of efficacy of ustekinumab in pemphigus vulgaris. *Dermatology Online Journal* 2013;19(3):15-16

73. Gürcan HM, Ahmed AR. Efficacy of dapsone in the treatment of pemphigus and pemphigoid: analysis of current data. *Am J Clin Dermatol* 2009;10:383-396.
74. Werth VP, Fivenson D, Pandya AG, Chen D, et al. Multicenter randomised placebo-controlled clinical trial of dapsone as a glucocorticoid-sparing agent in maintenance phase pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 2008;144:25-34.
75. El-Darouti M, Marzouk S, Hay RA. The use of sulfasalazine and pentoxifilline (low-cost antitumor necrosis factor drugs) as adjuvant therapy for the treatment of pemphigus vulgaris: a comparative study. *Br J Dermatol* 2009;161:313-319.

ANEXO 1

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“Identificación de polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con pénfigo vulgar del Hospital General de México”

Esta forma de consentimiento informado pudiera tener palabras que usted no entienda. Le pedimos que pregunte al médico del estudio que le explique cualquier palabra que usted no comprenda totalmente.

1. El proyecto de investigación corresponde a riesgo mínimo, esto es, debido a la extracción de sangre por punción venosa, que se explicará más adelante.

2. Apartados

I. Se me invita a participar en un trabajo de investigación debido a que padezco una enfermedad llamada Pénfigo Vulgar, que es una enfermedad ampollosa de la piel y las mucosas. En este estudio se evaluará en mi muestra de sangre que se obtenga si hay un “*Polimorfismo Genético*” cuya definición es “Una variación heredada en mi material genético (ADN), que se encuentra en menos del 1% de la población”. Se piensa que esta variación del material genético se relaciona con mi respuesta al tratamiento. Para llevar a cabo esto se necesitará una muestra de sangre (5 mL) que se procesará sin costo alguno.

II. Si participo en este estudio, los médicos encargados del protocolo requieren que acuda 1 vez a la toma de muestra de sangre. La toma de muestra de sangre de 5mL es el único procedimiento invasivo que se me realizará y que implicará una molestia transitoria en el sitio de la punción. El objetivo de esta toma de muestra es evaluar si hay alguna variación de material genético que se relacione con mi respuesta al tratamiento.

III. Además del tiempo que invierta en la consulta, puedo tener alguna de las siguientes molestias:

- La inyección en la vena del brazo para obtener la muestra de sangre de 5mL puede causar molestias en el sitio de la inyección como formación de un moretón y dolor, por poco tiempo, que no me impedirá hacer mis actividades normales ni dejará secuelas en otras partes del cuerpo. Debido a que la muestra de sangre se tomará con todas las medidas de higiene, prácticamente se evitará cualquier tipo de contaminación en el sitio de la inyección, que si se presentara sería solo enrojecimiento, hinchazón en el sitio de la inyección con dolor, que se elimina con el uso de medicamentos que serían proporcionados por el investigador en caso de presentarse lo anterior. Mi participación en el estudio podría no beneficiarme, pero si podría ayudar a otras personas que

tienen la misma enfermedad que padezco, todo esto, gracias a la información que obtengamos.

IV. El médico del estudio está para responderme cualquier pregunta que pueda tener acerca del estudio de laboratorio ó dudas que pudieran surgir con respecto al protocolo.

V. Yo como paciente no renuncio a ninguno de mis derechos legales por el hecho de firmar esta carta de consentimiento. Mi firma como paciente indica que he leído y comprendido la información de esta carta.

Además, al firmarla reconozco que se me ha explicado el estudio y que he podido hacer preguntas sobre todo lo que no entendía bien y que éstas han sido respondidas satisfactoriamente. Asimismo, comprendo que mi participación en el estudio es totalmente voluntaria (no es obligado). El no desear participar en el estudio no me traerá ningún problema, nadie se enojará conmigo como paciente o con mis familiares y mi decisión no tiene nada que ver en la atención médica a la que yo como paciente tengo derecho en esta institución de salud.

VI. Como paciente tengo derecho a que nadie sepa que participé en el estudio y toda la información que se obtenga en éste será confidencial, dentro de los límites que marque la ley.

Es posible que los resultados del estudio, se publiquen en una revista seria, por lo que mediante la firma de este documento lo autorizo, siempre y cuando se mantenga secreta u oculta mi identidad.

VII. Como paciente y la persona que designe como mi responsable legal tenemos derecho a conocer los resultados del estudio de laboratorio practicado, también a que se nos explique lo que significa dicho resultado.

VIII y IX. Como paciente del protocolo no se me hará ningún cobro económico por el marcador de laboratorio ni por la (s) consulta (s) relacionadas con el estudio. El marcador de laboratorio será gratuito sólo durante el estudio. La atención de problemas de salud que no se relacionen con este estudio seguirá siendo mi responsabilidad.

Como paciente participante del protocolo no recibiré compensación económica por la participación en el estudio, así como ninguno de mis familiares tampoco recibirá ningún tipo de gratificación económica.

En caso de algún problema relacionado con la investigación y que requiera ser revisado por un médico, este servicio será proporcionado en su totalidad por los investigadores hasta su resolución. No será posible la ayuda económica (indemnización) en caso de algún tipo de complicación relacionada con el estudio debido a que no se cuenta con recursos suficientes.

XI y XII.

Nombre o huella digital del paciente

Fecha _____

Familiar o Responsable legal

Fecha _____

Testigo 1 (Nombre y Dirección)

Fecha _____ Relación con el paciente

Testigo 2 (Nombre y Dirección)

Fecha _____ Relación con el paciente

XIII. Si en algún momento tengo cualquier pregunta relacionada con este estudio o experimento puedo contactar a la Dra. Rosa María Ponce Olivera, al conmutador 2780-2000 ext. 1055 (lunes a viernes de 8 a 16hrs) si tengo una lesión relacionada con la investigación, contactaré de inmediato a la Dra. Etna Laura Guerrero Sánchez al 2780-2000 ext. 1052 (lunes a viernes de 8 a 16hrs). En su defecto al Dr. Andrés Tirado Sánchez al cel. 5527-44-2811 (24hrs). Si tengo cualquier pregunta respecto a mis derechos como paciente de investigación, puedo comunicarme con la Dra. Estela García Elvira, Presidenta de la Comisión de Ética del Hospital General de México, en

la calle Dr. Balmis 148, Col. Doctores, México, D.F. al teléfono 2789-2000 extensión 1368.

XIV. En caso de requerir atención médica acudir al Servicio de Dermatología del Hospital General de México de lunes a viernes de 8 a 16hrs o al Servicio de Urgencias del mismo Hospital disponible las 24hrs. Puedo decidir no participar en el estudio, o, si decido participar en el estudio como paciente me podré retirar en cualquier momento.

XV. Mi decisión de no participar o de retirarme del estudio, no significará ningún castigo o pérdida de beneficios a los cuales tenga derecho, y no evitará mi acceso ni a la atención, ni al tratamiento médico. Si decido retirarme, notificaré al Dr. Andrés Tirado Sánchez por escrito y le haré saber que me estoy retirando del estudio.

Si el paciente participante del protocolo o sus familiares creen que existe algún problema relacionado con este estudio, por favor contacte (n) de inmediato al Dra. Etna Laura Guerrero Sánchez al conmutador 2780-2000 ext. 1052 (lunes a viernes de 8 a 16hrs) o a la Dra. Rosa María Ponce al conmutador 2780-2000 ext. 1055 (lunes a viernes de 8 a 16hrs), al Dr. Andrés Tirado al cel. 5527-44-2811 (24hrs) o a la Dra. Estela García Elvira Presidenta de la Comisión de Ética al 2789-2000 ext. 1368

ANEXO 2

Carta de Consentimiento para realizar estudio genético y para la toma de muestra.

Protocolo: “Identificación de polimorfismos del gen CTLA-4 en pacientes con pénfigo vulgar del Hospital General de México”

Por medio de este documento como paciente entiendo los siguientes puntos:

1. Que las muestras de sangre tomadas en el estudio serán exclusivamente para estudios genéticos. La realización de dicho estudio será para determinar si hay la presencia de “*Polimorfismos Genéticos*” en mi enfermedad (Pénfigo Vulgar).

Definición de Polimorfismo: “Una variación heredada en mi material genético (ADN), que se encuentra en menos del 1% de la población”.

2. El estudio se va a realizar con una muestra de mi sangre (5 mL) que necesitan los médicos encargados del protocolo.
3. La muestra de sangre periférica se identificará con mis iniciales y/o clave, número de expediente y diagnóstico. Solo el investigador responsable tendrá acceso a dicha información.
4. Como paciente tengo derecho a aceptar participar en el trabajo de investigación, pero, al mismo tiempo, puedo negarme a que me tomen muestras para estudios genéticos.

Firma del paciente

Firma del investigador

Firma del testigo

Doy mi consentimiento para la toma de muestra.

No doy mi consentimiento para la toma de muestra.

Doy mi consentimiento para los estudios genéticos.

No doy mi consentimiento para los estudios genéticos.