



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN
PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARIANA CHIAPA LABASTIDA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. INGEBORG BECKER

COMITÉ TUTORAL

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ

MÉXICO, D.F.

ENERO DE 2012



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.

A Lolo y Agüis, Ana y Carlos, Carlos y Ruy

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por todo el apoyo brindado para realizar mis estudios.
- Agradezco al CONACyT por la beca otorgada.
- Este trabajo fue apoyado por PAPIIT (IN220109) y CONACyT (47256-M y 102155).
- Agradezco a los integrantes de mi Comité Tutoral, Dra. Ingeborg Becker, Dr. Alejandro Zentrella Dehesa y Dr. José Moreno Rodríguez.
- Agradezco a los sinodales por haber revisado esta tesis.
- Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.
- Agradezco a Inge por haberme dado la oportunidad de conocer esta otra parte de la Medicina y por su gran apoyo.
- A Armando Pérez Torres por haberme permitido aprender inmunohistoquímica en su laboratorio y por sus consejos acerca de cortes, tinciones y fotografías de tejidos.
- A Cristina por haberse animado a domar a las bestias y, por supuesto, por su amistad.
- A Edith por todos esos minutos de introspección y esas horas de trámites.
- A Alma y Arturo por los días y noches de agradable compañía.
- A Joselín por los retos mentales y por hacer que le perdiera el miedo al citómetro.
- Y a todos los demás que me ayudaron cuando lo necesité o que simplemente hicieron mi estancia en Medicina Experimental muchísimo más placentera: Marco, Norma, Miriam, Rocely, Adriana, José, Berenice, Jesús, Lorena, Carlos, Jaime, Laura, Silvia...
- A Tere por invitarme al bote de nuevo y hacer que corriera durante casi 4 años.
- A mis papás por todas las oportunidades que me dieron en la vida.
- A mi hermano por hacerme resistente a todas las adversidades, empezando por él...
- Y por supuesto, a Ruy por esa paciencia infinita y por llevarme a la aventura...

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Pénfigo vulgar	11
1.1.1 Epidemiología	11
1.1.2 Etiología	12
1.1.3 Autoanticuerpos	13
1.1.4 Mecanismo de acantólisis dependiente de anticuerpos	15
1.1.5 Mecanismo de acantólisis independiente de anticuerpos.....	18
1.1.6 Apoptosis en PV	19
1.2 Apoptosis	20
1.2.1 Eferocitosis	21
1.2.2 Necrosis secundaria.....	22
2. ANTECEDENTES	23
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Pacientes y controles.....	27
5.2 Biopsias.....	28
5.3 Inmunohistoquímica (IHQ)	28
5.4 TUNEL (Terminal dUTP nick end labeling)	30
5.5 Dobles tinciones.....	30

5.6 Cultivo de 3T3 y KC	31
5.7 Separación y cultivo de monocitos de sangre periférica.....	32
5.8 Inducción de apoptosis y necrosis de KC	33
5.9 Marcaje de KC con CFSE y ensayo de fagocitosis.....	34
5.10 Co-cultivo de monocitos y KC para determinación de TNF	35
5.11 Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Abundante apoptosis en la piel de pacientes con PV	37
6.2 Células del sistema fagocítico mononuclear en la piel de pacientes con PV ...	41
6.2.1 CD1a+	42
6.2.2 CD14+	45
6.3 Las células dérmicas apoptóticas incluyen células dendríticas CD1a+, monocitos/macrófagos CD14+ y linfocitos CD4+	48
6.4 TNF está incrementado en la dermis de pacientes con PV	50
6.5 Monocitos fagocitan KC-A pero no KC-V ni KC-N	53
6.6 Una menor relación monocitos/KC-A ocasiona una mayor producción de TNF por parte de los monocitos.....	57
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES	66
9. REFERENCIAS.....	66
10. APÉNDICE	79
10.1 Reactivos	79
10.2 Preparación de soluciones.....	80
10.2.1 Buffer de unión.....	80
10.2.2 Buffer de sustrato	80
10.2.3 D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline).....	81
10.2.4 D-PBS con Ca ²⁺ y Mg ²⁺	81
10.2.5 DMEM 10% SFB.....	82
10.2.6 EDTA 5 mM en D-PBS 50%/ RPMI 50%	82

10.2.7 HEPES calcio	82
10.2.8 Medio primario para KC	83
10.2.8.1 Solución de adenina	83
10.2.8.2 Solución de hidrocortisona.....	83
10.2.8.3 Solución de T3.....	84
10.2.9 Medio final para KC	84
10.2.9.1 Solución de EGF.....	85
10.2.9.2 Solución de toxina del cólera.....	85
10.2.10 Paraformaldehído al 2% ó 4%	85
10.2.11 RPMI 1640 10% SFB	86
10.2.12 Solución bloqueadora para ELISA	86
10.2.13 Solución bloqueadora para IHQ	87
10.2.14 Solución de permeabilización	87
10.2.15 Solución para diluir el anticuerpo de detección.....	87
10.2.16 Solución para lavar placas.....	87
10.2.17 Tripsina 0.1%/EDTA 0.02%.....	88

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Características de los pacientes con pénfigo vulgar incluidos en el estudio .	27
Tabla 2: Características de los controles sanos incluidos en el estudio.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Acantólisis suprabasal	11
Figura 2: Desmosmas, uniones de adhesión intercelular	14
Figura 3: Incremento de células apoptóticas en epidermis de pacientes con PV	39
Figura 4: Incremento de células apoptóticas en dermis de pacientes con PV	41
Figura 5: Distribución y proporción de células CD1a+ en epidermis y dermis de pacientes con PV	44

Figura 6: Distribución y proporción de células CD14+ en epidermis y dermis de pacientes con PV	47
Figura 7: Dentro de las células dérmicas apoptóticas se encuentran células dendríticas CD1a+, monocitos/macrófagos CD14+ y linfocitos CD4+	50
Figura 8: TNF está incrementado en dermis de pacientes con PV	52
Figura 9: Pureza de monocitos	54
Figura 10: Monocitos fagocitan a KC-A, pero no KC-V ni KC-N	56
Figura 11: KC-A producen una cantidad mínima de TNF	57
Figura 12: Una mayor proporción de KC-A lleva a una mayor producción de TNF por parte de monocitos	59

ABREVIATURAS

AEC- Aminoetilcarbazol

AP- Fosfatasa alcalina

BSA- Albúmina sérica bovina

C3A- Caspasa 3 activada

CFSE- Carboxyfluorescein succinimidyl ester

D-KC-SFM- Defined Keratinocyte Serum Free Medium

D-PBS- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DAB- Diaminobencidina

DAMPs- Patrones moleculares asociados a daño

DE- Desviación estándar

Dsg- Desmogleína

EGF- Factor de crecimiento epidérmico

EGFR- Receptor del factor de crecimiento epidérmico

HMGB 1- Proteína de unión al grupo de alta movilidad 1

IHQ- Inmunohistoquímica

IL- Interleucina

IP- Ioduro de propidio

KC-SFM- Keratinocyte Serum Free Medium

PE- Ficoeritrina

KC- Queratinocitos

KC-A- Queratinocitos apoptóticos

KC-N- Queratinocitos necróticos

KC-V- Queratinocitos vivos

LPS- Lipopolisacárido

MHC- Complejo mayor de histocompatibilidad

Mo- Monocitos

PI3K- Fosfatidilinositol 3-cinasa

POD- Peroxidasa

PRR- Receptores de reconocimiento de patrones

PV- Pénfigo vulgar

RAGE- Receptor para productos finales de glicosilación avanzada

sFasL- Fas ligando soluble

SFB- Suero fetal bovino

TLRs- Receptores tipo Toll

TNF- Factor de necrosis tumoral

TUNEL- Terminal dUTP nick end labeling

RESUMEN

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad ampollosa, autoinmune de piel y mucosas. Está mediada por autoanticuerpos dirigidos contra la superficie de queratinocitos (KC), pero otros mediadores humorales, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF), también contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. En la epidermis de pacientes con PV se ha descrito la presencia de células apoptóticas y la acumulación de células apoptóticas se ha asociado a enfermedades inflamatorias crónicas. El objetivo de este trabajo fue determinar la proporción de células apoptóticas en epidermis y dermis de pacientes con PV, así como la presencia y distribución de células fagocíticas, y analizar si monocitos expuestos a grandes cantidades de células apoptóticas podrían contribuir a la respuesta inflamatoria a través de la producción de TNF. Mediante TUNEL e inmunohistoquímica para caspasa 3 activada encontramos un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas tanto en epidermis como en dermis con lesión y perilesional de pacientes con PV en comparación con epidermis y dermis de controles sanos. Las células dendríticas CD1a y monocitos/macrófagos CD14+, que en general estuvieron incrementados en piel con lesión y perilesional de pacientes con PV en comparación con piel de controles sanos, estuvieron localizadas predominantemente en la dermis. También se detectó una mayor tinción de TNF en piel con lesión y perilesional de pacientes con PV mediante IHQ, especialmente en la dermis, que en piel de controles sanos. Adicionalmente, monocitos derivados de sangre periférica cocultivados *in vitro* con KC apoptóticos (KC-A), pero no con KC vivos (KC-V) ni necróticos (KC-N), produjeron TNF, que se correlacionó con el número de KC-A. Tomando en cuenta los resultados, proponemos que la acumulación de células apoptóticas en dermis y epidermis de pacientes con PV puede contribuir al daño a través de la producción de TNF por monocitos, que a su vez, puede causar una mayor muerte celular, cerrando así un círculo vicioso que puede favorecer la progresión de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Pénfigo vulgar

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad humoral autoinmune, de piel y mucosas, que clínicamente se caracteriza por la presencia de ampollas frágiles. Éstas se rompen fácilmente, causando excoriaciones y, en ocasiones, denudaciones extensas. La característica histológica principal, responsable de la formación de ampollas, es la acantólisis, pérdida de adhesión entre los queratinocitos (KC), por encima de la capa basal de la epidermis (Fig. 1).

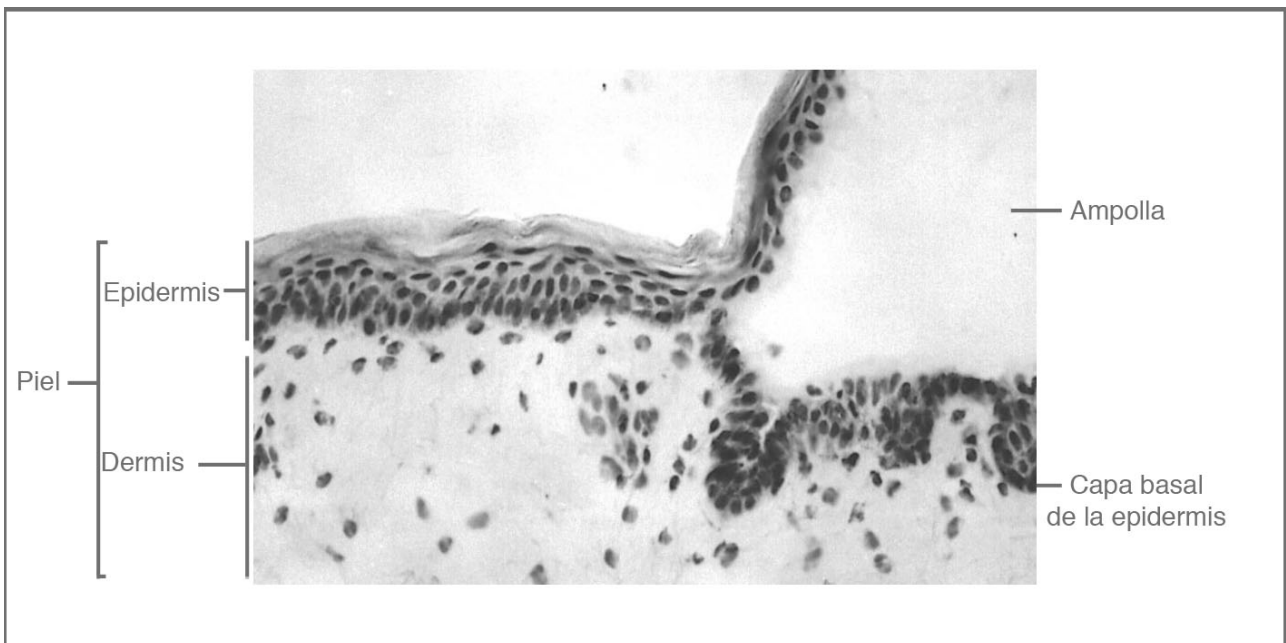


Fig. 1: Acantólisis suprabasal. Micrografía de luz de un corte de piel donde se observa, del lado derecho, acantólisis por encima de la capa basal de la epidermis. (Fotografía: Dr. Armando Pérez Torres, Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM).

1.1.1 Epidemiología

El PV, a diferencia de la mayoría de las enfermedades autoinmunes, afecta a mujeres y hombres en la misma proporción, e inicia tardíamente en la vida, entre los 40 y los 60

años de edad [1]. La incidencia en México se desconoce, pero en otros países se ha reportado que afecta desde 2 hasta 6.8 personas por millón de habitantes por año [2, 3].

1.1.2 Etiología

Hasta el momento, la etiología del PV sigue sin conocerse, pero se cree que esta enfermedad se presenta en personas genéticamente susceptibles tras el contacto con ciertos factores ambientales.

El PV se encuentra en un grupo de enfermedades autoinmunes con asociación HLA casi absoluta. Se han encontrado consistentemente, y en muy diversas poblaciones, dos alelos HLA-DR que incrementan la susceptibilidad a desarrollar PV: HLA-DR4 y HLA-DR14, específicamente HLA-B1*0402 y HLA-DRB1*1401 [4-8]. Otros dos alelos HLA-DQB1 que también se han asociado con un mayor riesgo de padecer PV son: HLA-DQB1*0302 y HLA-DQB1*0503 [7-10]. En población mexicana, específicamente, se ha encontrado una asociación con HLA-DR14 [11]. Los alelos HLA-DR y HLA-DQ codifican para complejos de histocompatibilidad mayor (MHC, por sus siglas en inglés, *Major Histocompatibility Complex*) de clase II que se han implicado en la presentación de epítomos de desmogleína (Dsg) 3 a linfocitos T auto-reactivos [12]. La Dsg3 es el autoantígeno principal en PV.

Aun no se sabe con certeza cuál es el estímulo (¿o los estímulos?) que causa(n) la pérdida de tolerancia a ese autoantígeno en personas genéticamente susceptibles; sin embargo, la exposición a ciertos factores ambientales se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Entre ellos están fármacos con un grupo tiol en su estructura como la D-penicilamina y el captopril [13], materiales de jardinería, pesticidas, vapor de metales [14] y el virus herpes humano tipo 8 [15].

1.1.3 Autoanticuerpos

La pérdida de tolerancia, favorecida por la carga genética y la exposición a ciertos factores ambientales, lleva entonces a la producción de autoanticuerpos. El PV es una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra antígenos presentes en la superficie de los KC [16]. Todos los pacientes tienen anticuerpos contra desmogleína (Dsg)3 [17] y muchos pacientes tienen también anticuerpos contra Dsg1 [18]. Las desmogleínas son glucoproteínas transmembranales de adhesión. La mayoría de las desmogleínas forma parte de los desmosomas, uniones de adhesión intercelular [19] (Fig. 2), pero existen también desmogleínas no desmosomales transadherentes que juegan un papel importante en la homeostasis celular [20]. Debido a que los autoanticuerpos están dirigidos contra moléculas de adhesión, es tentador pensar que la acantólisis ocurre cuando los autoanticuerpos bloquean la función de adhesión de las desmogleínas. Sin embargo, el mecanismo de acción de los autoanticuerpos es mucho más complejo de lo que parece, como se verá más adelante.

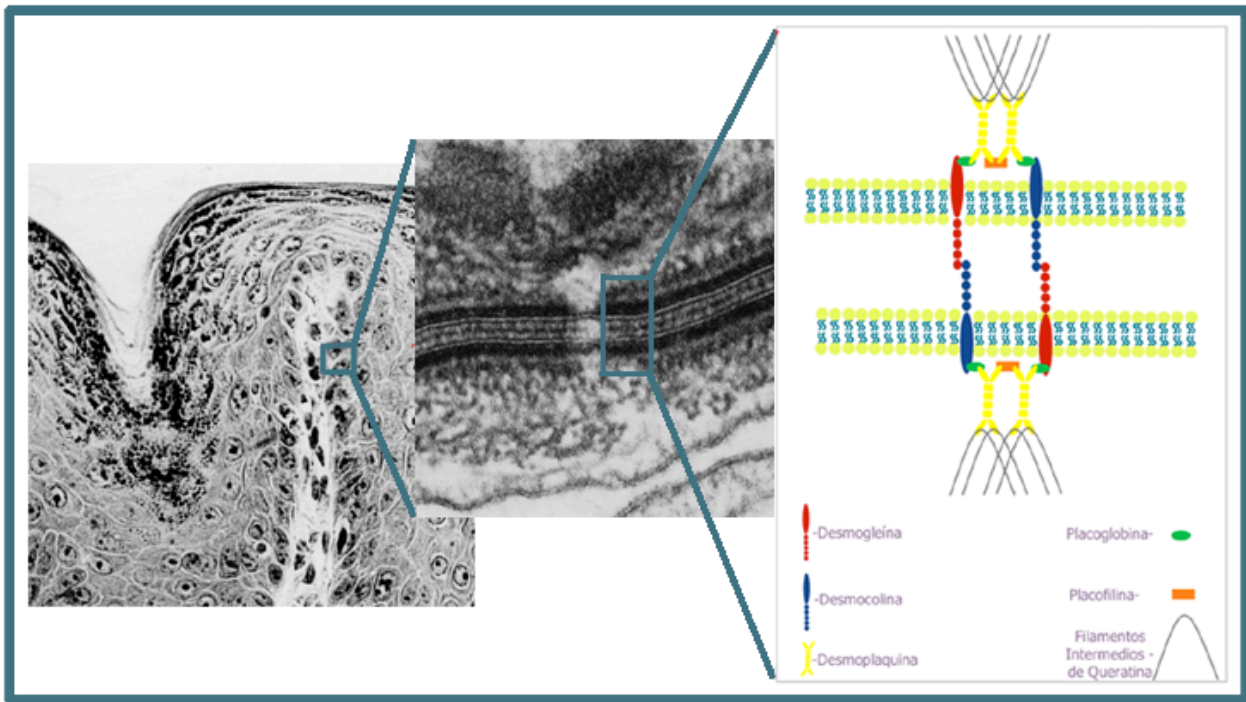


Fig. 2: Desmosomas, uniones de adhesión intercelular. Del lado izquierdo se muestra una microfotografía de un corte de piel donde se resaltan dos queratinocitos (KC) en la epidermis. Si se observara a mayor aumento con un microscopio electrónico de transmisión el espacio entre los dos KC, se vería algo similar a lo de la imagen central, que es una micrografía electrónica de una unión intercelular tipo desmosoma. Del lado derecho se observa un esquema de un desmosoma donde se muestran las proteínas que forman parte de una unión intercelular. (Fotografías: Dr. Armando Pérez Torres, Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM).

Los anticuerpos contra Dsg3 y Dsg1 no son los únicos que se han encontrado. Muchos pacientes también tienen autoanticuerpos contra otras proteínas desmosomales como desmoplaquina [21] y placoglobina [22], contra otras moléculas de adhesión como E-cadherina [23], contra receptores como la anexina 31 [24] y el receptor para acetilcolina $\alpha 9$ [25], e incluso, se han reportado anticuerpos anti-mitocondriales [26].

Está bien establecido que los autoanticuerpos en PV son patogénicos: los bebés de madres con PV pueden presentar la enfermedad durante las primeras semanas de vida, hasta que catabolizan las inmunoglobulinas maternas [27]. En el modelo murino de

transferencia pasiva, al inyectar suero de pacientes con PV a ratones neonatos BALB/c se produce acantólisis con histología típica de PV y formación de ampollas [28]. La IgG de pacientes con PV, sin complemento y sin células inflamatorias, puede inducir pérdida de adhesión celular en cultivos de KC [29]. La evidencia que apoya la participación de los autoanticuerpos es abundante. El problema ha sido descubrir su mecanismo de acción.

1.1.4 Mecanismo de acantólisis dependiente de anticuerpos

A lo largo de los años, se han propuesto muchas hipótesis para tratar de explicar la pérdida de adhesión entre los KC: bloqueo estérico [17, 30], activación de complemento [31], activación de proteasas [32] y señalización de afuera hacia adentro [20]. La activación del complemento [33] y la activación de proteasas [34, 35] ya se han descartado, pero el bloqueo estérico y la señalización de afuera hacia adentro parecen estar relacionadas entre sí y están directamente involucrados con la acantólisis.

La hipótesis del bloqueo estérico propone que los autoanticuerpos anti-Dsg3 bloquean físicamente el sitio de adhesión de la Dsg3, evitando su unión. Existe evidencia que apoya a esta hipótesis. Primero, los autoanticuerpos en PV son policlonales [36, 37] y solo aquellos dirigidos contra la porción aminoterminal de la Dsg3, que es la parte adhesiva de la molécula, son patogénicos [37, 38]. Segundo, se ha comprobado, tanto con microscopía de fuerza atómica de molécula única en un sistema libre de células, como con pinzas de láser en células HaCat (una línea celular de KC humanos), que los autoanticuerpos de PV inhiben directamente la transinteracción entre moléculas de Dsg3 [39]. Tercero, péptido- miméticos que estabilizan la transinteracción de moléculas de Dsg3 bloquean parcialmente la acantólisis inducida por anticuerpos de PV [40]. Interesantemente, micrografías electrónicas de lesiones de PV demuestran que los KC se separan primero en áreas interdesmosomales, mientras que los desmosomas permanecen

adheridos [41, 42]. Esto indica que son las desmogleínas interdesmosomales las que pierden el contacto unas con otras, no así las desmosomales.

Las moléculas de Dsg3 transadherentes, que son las moléculas de Dsg3 de células adyacentes que están haciendo contacto, están señalizando constantemente. Al ser bloqueado el sitio de adhesión de la Dsg3 por los autoanticuerpos, la señalización normal se ve interrumpida y comienza una nueva transducción de señales de afuera hacia adentro [20]. Esta señalización contribuye a la acantólisis por lo menos de tres maneras distintas: 1) promoviendo la proliferación de la capa basal de la epidermis [20], 2) favoreciendo el encogimiento de los KC por desestabilización del citoesqueleto [43] y 3) induciendo apoptosis de los KC [20, 44, 45].

La proliferación de la capa basal de la epidermis ocurre porque la Dsg3 transadherente interdesmosomal está involucrada, junto con la E-cadherina, en el control del ciclo celular. Ambas actúan sinérgicamente para inducir arresto celular vía Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt [20]. La vía PI3K/Akt tiene diversas actividades en la epidermis, incluyendo arresto de la proliferación en la capa basal, así como diferenciación terminal y supervivencia de KC en las capas suprabasales [46, 47]. En la capa basal de la epidermis, cuando se interrumpe la transadhesión de Dsg3 por anticuerpos anti-Dsg3, ocurre proliferación de KC [48, 49], probablemente por interrupción de la vía PI3K/Akt [20]. Dado que las células proliferantes reducen su adhesión y sufren “redondeo celular”, el fenómeno de proliferación contribuye a la acantólisis [20].

Además de la proliferación de la capa basal de la epidermis, se ha propuesto que la desestabilización del citoesqueleto también favorece al encogimiento de los KC y la acantólisis. Poco tiempo después de la unión de autoanticuerpos de PV a la superficie de

los KC se ha observado retracción de tonofilamentos en los KC, así como ruptura de la unión entre tonofilamentos y desmosomas, que culminan en el encogimiento de las células basales [43]. Se ha propuesto que este encogimiento de células basales causa pérdida de adhesión intercelular al lograr que los desmosomas se desprendan unos de otros por fuerza mecánica [43]. En este proceso de encogimiento celular se ha observado participación tanto del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*) como de Src. Mediante estudios con PP2 y PD169316, que son inhibidores de la cinasa Src y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), respectivamente, se ha logrado evitar el encogimiento celular y la agregación de filamentos de queratina en cultivos de KC tratados con autoanticuerpos de PV [50].

Finalmente, aunque ha habido mucho debate al respecto, también se ha propuesto que la apoptosis de KC causada por anticuerpos de PV es otra de las causas de la acantólisis. En PV se ha demostrado que ocurre apoptosis de KC. Lo que hasta la fecha se discute es si la apoptosis es causa o consecuencia de la acantólisis. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la inducción de apoptosis por los anticuerpos de PV. Uno de ellos es la interrupción de la vía PI3K/Akt. En las capas basales de la epidermis, donde los KC tienen contacto con la membrana basal, la interrupción de la vía PI3K/Akt causa proliferación de estas células. En las capas suprabasales, donde los KC no tienen contacto con la membrana basal, la interrupción de la vía PI3K/Akt más bien causaría apoptosis de los KC [20]. Otro de los mecanismos propuestos depende de EGFR. Tras la unión de autoanticuerpos de PV con sus antígenos membranales, ocurre activación del EGFR [44, 50, 51]. El EGFR pertenece al grupo de tirocincinasas asociadas a receptor, proteínas transmembranales con actividad intrínseca de tirocincinasa. El EGFR fosforilado fosforila a su vez a la proteína Src en la capa basal de la epidermis, que a su vez activa a

mTOR, una cinasa involucrada en la regulación de la supervivencia celular [44]. Aparentemente, la activación de mTOR está relacionada con la inducción de apoptosis en las células de la capa basal de la epidermis, ya que si se inhibe mTOR con Rapamicina, Src con PP1 o las isoformas HER con Erlotinib, se evita la apoptosis de las células basales y la acantólisis en un modelo murino de PV [44]. Las proteasas involucradas en la ejecución de la apoptosis se han implicado en el encogimiento celular por la escisión de tonofilamentos y de las colas citoplasmáticas de las desmogleínas [45]. Debido a que EGFR y Src están involucradas tanto en el encogimiento celular como en la apoptosis de los KC, es difícil saber cuál de los dos mecanismos es la causa de la acantólisis. De hecho, el escenario se complica todavía más porque se ha observado que no solo los anticuerpos de PV causan pérdida de adhesión entre los KC, sino que otros mecanismos humorales también contribuyen.

1.1.5 Mecanismo de acantólisis independiente de anticuerpos

Existe evidencia de que los autoanticuerpos no son los únicos mediadores de la acantólisis en PV [52-54]. Recientemente se reportó que células HaCaT expuestas a suero de pacientes con PV depletado de anticuerpos, presentan pérdida parcial de las interacciones intercelulares, reducción de la viabilidad celular y reducción de la fuerza de adhesión intercelular [52], eventos directamente ligados a la acantólisis. Se cree que estos fenómenos se deben a la acción de distintos mediadores inflamatorios producidos al presentarse la enfermedad. En el suero y en el líquido de ampollas de pacientes con PV se han encontrado niveles elevados de diferentes mediadores inflamatorios como interleucina (IL)-1, IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés, *Tumor Necrosis Factor*) e IL-10 [55, 56]. Más aún, los niveles de estas citocinas correlacionan con la actividad de la enfermedad [57-59]. De estas citocinas, la participación de IL-1 y TNF en la acantólisis ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* [53]. Al incubar KC

humanos con suero de pacientes con PV activo, se incrementó la expresión de ambas citocinas y los KC presentaron pérdida de la adhesión intercelular. Ambos fenómenos disminuyeron al incubarse previamente a los KC con anticuerpos anti-IL-1 α y anti-TNF [53]. Más aún, ratones deficientes en IL-1 α , TNF-R1 y TNF-R2 fueron menos susceptibles a desarrollar lesiones tras la transferencia pasiva de anticuerpos de PV que los ratones normales [53]. Otro mediador inflamatorio que se ha encontrado elevado en el suero de pacientes con PV es Fas ligando soluble (sFasL) [60, 61]. Interesantemente, se demostró que existe un sinergismo entre los autoanticuerpos de PV, sFasL y TNF en la disminución del tamaño celular y la generación de acantólisis en KC *in vitro* [54]. Aunque no se ha estudiado aún, es probable que tanto TNF como sFasL induzcan apoptosis de los KC y de esa manera contribuyan a la acantólisis. Sobre todo si consideramos que si se inhibe PI3K, fenómeno que ocurre al interrumpirse el contacto de la Dsg3 transadherente, los KC se vuelven susceptibles a la apoptosis inducida por TNF [62]. Al final, los mecanismos de acción tanto de autoanticuerpos como de otros factores humorales en PV parecen convergir en un mismo fenómeno: apoptosis.

1.1.6 Apoptosis en PV

La apoptosis en PV se descubrió desde hace más de una década al intentar determinar si la pérdida de adhesión entre los KC podría llevar a anoikis en enfermedades ampollosas. La anoikis es un tipo de apoptosis desencadenado por pérdida de adhesión al sustrato. Se tomaron biopsias de pacientes con diversas enfermedades ampollosas, entre ellos 4 pacientes con PV, y se buscó apoptosis de KC mediante TUNEL (por sus siglas en inglés, *Terminal dUTP Nick End Labeling*). No en todas las enfermedades ampollosas se observó apoptosis, pero en PV se encontraron abundantes KC positivos para TUNEL, con morfología de células apoptóticas, tanto en zonas con acantólisis como en zonas cohesivas. En ese momento se propuso que la apoptosis probablemente dependía del

tipo de unión intercelular que estaba afectada en PV pero no en las otras enfermedades ampollasas [63]. Después de eso, la apoptosis cayó en el olvido y no fue hasta que se propuso como posible causa de la acantólisis [61], que resurgió como un tema importante en PV. En biopsias de pacientes con PV se ha demostrado la presencia de KC apoptóticos (KC-A), tanto en epidermis con lesión como perilesional [60, 61, 63]. También *in vitro* se ha demostrado que los autoanticuerpos de PV inducen apoptosis de KC [61, 64-66]. Recientemente se publicó que la apoptosis no es necesaria para que ocurra acantólisis en PV [67], sin embargo, es innegable que, ya sea antes o después de la acantólisis, los KC mueren por apoptosis en la epidermis de pacientes con PV.

1.2 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que confiere a las células ciertas características morfológicas bien definidas. Entre ellas se encuentran reducción del volumen celular y nuclear (encogimiento celular), redondeo de la célula, vesiculación de la membrana y fragmentación nuclear [68]. La apoptosis ocurre como consecuencia de la acción de caspasas, proteasas de serina presentes en todas las células como precursores inactivos. Las caspasas pueden ser activadas por dos vías diferentes, la extrínseca que es activada por receptores celulares como Fas o TNFR-1, y la intrínseca o mitocondrial, que depende de la familia Bcl-2. Independientemente del estímulo que desencadene la apoptosis, ambas vías activan a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, que se encargan de cortar un gran número de proteínas intracelulares que pierden su función por completo o adquieren una nueva función [69, 70]. Este procesamiento de sustratos vuelve únicas a las células apoptóticas, les permite llamar refuerzos y desaparecer sin dejar rastro. La escisión de proteínas les confiere la morfología típica [71], les permite generar lisofosfatidilcolina, un quimioatrayente potente para fagocitos [72] y les da ciertas características bioquímicas que las hacen irresistibles para ser fagocitadas, entre ellas la

exposición de fosfatidilserina en la parte externa de la membrana celular [73]. Es por todo eso que, en condiciones normales, las células apoptóticas son eliminadas rápidamente, antes de que puedan perder la integridad de la membrana y liberar el contenido intracelular. La integridad membranal las distingue de las células necróticas y hace que la eferocitosis (o fagocitosis de células apoptóticas) tenga consecuencias diferentes a la fagocitosis de células necróticas.

1.2.1 Eferocitosis

El nombre de eferocitosis viene del latín *effero* que quiere decir llevar a la tumba o enterrar. Este evento final de la muerte apoptótica es un proceso altamente eficiente. En un estudio de eliminación celular se administró dexametasona a ratones para inducir apoptosis de timocitos. A diferentes tiempos, solo se podía detectar una proporción pequeña de timocitos apoptóticos, lo cual no sucedía cuando los ratones presentaban defectos en mecanismos de eliminación de células apoptóticas [74]. De igual forma, en la retina murina en desarrollo, la mayoría de las células apoptóticas que se observan ya fueron fagocitadas por macrófagos infiltrantes [75]. Por lo tanto, no sorprende que la proporción de células apoptóticas que se pueden observar en una sección de tejido normal teñida con hematoxilina y eosina, es baja debido al rápido proceso de eliminación [76]. La eferocitosis no solo depende de fagocitos profesionales. En condiciones normales se cree que las células apoptóticas son reconocidas y eliminadas por células vecinas viables, ya que diferentes células mesenquimales y epiteliales tienen la capacidad de fagocitar células apoptóticas [77]. Sin embargo, cuando se generan muchas células apoptóticas, como en lesiones tisulares o inflamación, entonces acuden células del sistema fagocítico mononuclear para participar en la eferocitosis [78].

Además de ser altamente eficiente, la eferocitosis se considera clásicamente un proceso antiinflamatorio. Existe evidencia de que las células apoptóticas no solo no causan inflamación, sino que activamente suprimen la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los fagocitos. La presencia de linfocitos apoptóticos durante la activación de monocitos humanos incrementó la secreción de IL-10, una citocina antiinflamatoria y reguladora, y disminuyó la producción de las citocinas proinflamatorias TNF, IL-1 e IL-12 [79]. Estos resultados se repitieron con neutrófilos apoptóticos [80]. Se ha observado también que macrófagos humanos, al fagocitar neutrófilos apoptóticos, producen menores cantidades de IL-1 β , IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF, leucotrieno C4 y tromboxano B2 al ser estimulados, e incrementan la producción de TGF- β 1, prostaglandina E2 y PAF. Las células apoptóticas no suprimen solamente la respuesta inflamatoria de fagocitos profesionales, también la de fagocitos no profesionales. La producción de TNF por células epiteliales de la glándula mamaria disminuyó cuando éstas fagocitaron células apoptóticas [81] y fibroblastos estimulados con IL-1 β dejaron de producir IL-6 al ser incubados con células apoptóticas [82].

El problema ocurre cuando la apoptosis es excesiva y las células no pueden ser removidas oportunamente porque entonces hay riesgo de que éstas evolucionen a células necróticas secundarias y generen una respuesta inflamatoria.

1.2.2 Necrosis secundaria

La necrosis secundaria ocurre cuando se retrasa o falla el proceso de eliminación de células apoptóticas. Las células pierden la integridad de la membrana celular y parte del contenido intracelular es liberado. Dado que algunas de las moléculas intracelulares ya se liberaron durante la apoptosis normal y otras moléculas inmunogénicas fueron procesadas por caspasas, las células necróticas secundarias tienen señales de peligro distintas a las

de las células necróticas primarias [83]. Aun así, las que se han descrito son proinflamatorias. Entre ellas están ácido úrico, que en células necróticas secundarias se ha encontrado aún más elevado que en las primarias, probablemente por la degradación de la cromatina, que incrementa en las fases finales de la apoptosis [84]. También se han detectado fragmentos de DNA en forma de oligonucleosomas en sobrenadantes libres de células, provenientes de linfocitos apoptóticos, capaces de estimular e inducir proliferación de linfocitos [85]. Más aun, la molécula HMGB-1 se ha encontrado asociada a esos nucleosomas [86, 87]. Se ha observado que los complejos nucleosoma-HMGB1 de células necróticas secundarias pueden inducir la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos, acción mediada en parte por la activación de MyD88 secundaria a la activación de TLR2 [87, 88].

Aun cuando la apoptosis es una forma fisiológica muy segura para eliminar células que sobran o se encuentran dañadas, es posible que cuando ocurre en exceso, como en PV, pierda sus efectos antiinflamatorios y favorezca daño por liberación de mediadores inflamatorios.

2. ANTECEDENTES

El PV es una enfermedad ampollosa autoinmune que involucra piel y membranas mediada por autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie de los KC [16]. Todos los pacientes con PV tienen autoanticuerpos contra Dsg3 [17] y muchos tienen también anticuerpos contra Dsg1 [18], sin embargo, se han descrito muchos otros autoanticuerpos dirigidos contra una gran variedad de antígenos de los KC [89]. La consecuencia de la unión antígeno-anticuerpo es la acantólisis, o pérdida de adhesión de los KC, que causa la aparición de ampollas intraepidérmicas. Durante muchos años se han tratado de descifrar los mecanismos exactos que llevan a la acantólisis, pero aun no

se han logrado comprender por completo. Aunque existe evidencia *in vitro* [29] e *in vivo* [28] de que los autoanticuerpos son patogénicos, se ha encontrado que otros mediadores humorales también contribuyen a la formación de las lesiones. Al iniciar el PV, comienza un proceso inflamatorio que lleva a la producción de diferentes mediadores humorales. Se han encontrado niveles incrementados de TNF, IL-1 e IL-6 en el suero y en el líquido de ampollas de pacientes con PV y sus niveles correlacionan con la actividad de la enfermedad [57, 59]. Específicamente, se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que las citocinas proinflamatorias TNF e IL-1 β desempeñan un papel importante en la acantólisis [53]. Más aún, TNF y FasL se han asociado directamente al desarrollo de la acantólisis actuando sinérgicamente con los autoanticuerpos contra Dsg3 [54]. Evidencia directa de la contribución del TNF a la patogénesis del PV proviene de reportes de casos acerca del tratamiento exitoso de pacientes con los antagonistas de TNF etanercept e infliximab. Ambos han sido utilizados exitosamente en pacientes con PV grave y resistente a tratamiento. Específicamente, etanercept causó una reducción dramática de la actividad de la enfermedad en 4 pacientes que no habían respondido a diversos agentes ahorradores de esteroides, permitiendo la reducción de la dosis de prednisona requerida para controlar los síntomas [90]. Interesantemente, en un paciente con PV recalcitrante tratado con infliximab se observó cese de la formación de ampollas en solo 48 horas [91]. Esto sugiere que el TNF participa directamente en la formación de lesiones, además de participar como inductor de la respuesta inmune. Aunque en PV el TNF es producido por KC como se demostró por RT-PCR [53], en ensayos de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) solo se detectó TNF en una proporción pequeña de pacientes, en células acantolíticas y células alrededor de la ampolla [92]. Por lo tanto es probable que exista otra fuente aun no identificada de TNF en pacientes con PV.

La acción combinada de Dsg3, TNF y FasL sobre los KC causa acantólisis, pero también induce apoptosis. En 1998, Gniadecki *et al.*, describieron la presencia de células apoptóticas en la epidermis de pacientes con PV [63] y desde entonces se ha reportado la presencia de células apoptóticas en la epidermis de pacientes con PV en varias ocasiones [60, 61, 93].

En organismos multicelulares, la apoptosis es un medio muy efectivo para eliminar células innecesarias, dañadas o peligrosas. La apoptosis ocurre en gran cantidad en el cuerpo, sin embargo, rara vez se detectan células apoptóticas en los tejidos [76] ya que son rápidamente fagocitadas y eliminadas [74]. En la mayoría de los tejidos, la remoción de células apoptóticas la llevan a cabo las células vecinas y, cuando hay demasiadas células apoptóticas, fagocitos profesionales [78]. En condiciones normales, la eferocitosis resulta en inmunosupresión activa a través de la producción de citocinas antiinflamatorias por parte de los fagocitos [94]. Sin embargo, si la eferocitosis no es oportuna y eficiente, las células apoptóticas se acumulan y existe el peligro de que evolucionen a células necróticas secundarias (postapoptóticas), que pierden la integridad membranal y dejan salir moléculas intracelulares citotóxicas y antigénicas a los tejidos circundantes [95]. De hecho, alteraciones en la eliminación de las células apoptóticas se han asociado a enfermedades inflamatorias crónicas y a autoinmunidad [96].

El hecho que se hayan detectado células apoptóticas en la epidermis de pacientes con PV es una indicación de que se están acumulando. Existe evidencia de que el TNF está elevado en el suero de los pacientes con PV. Aunque se ha visto que los KC pueden producir TNF [53], solo se ha detectado en pocos pacientes y se limita a células acantolíticas y a células alrededor de la ampolla [92]. Esto sugiere que debe de haber otra fuente de TNF en los pacientes con PV. El objetivo de este estudio fue determinar la

proporción de células apoptóticas, la presencia y distribución de células fagocíticas CD1a + y CD14+ en piel de pacientes con PV y analizar, tanto en biopsias de pacientes con PV como *in vitro*, si una elevada proporción de células apoptóticas pudiera estar contribuyendo a la respuesta inflamatoria al incrementar la producción de TNF por parte de monocitos CD14+.

3. HIPÓTESIS

Los monocitos, al ser estimulados con un exceso de KC-A, secretarán TNF que podría ser responsable de perpetuar la apoptosis presente en las lesiones de pacientes con PV.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar la participación de monocitos en el daño epidérmico de pacientes con PV.

4.2 Objetivos específicos

1. Buscar apoptosis en piel con lesión y perilesional de pacientes con PV.
2. Realizar análisis inmunohistoquímico de piel con lesión y perilesional de pacientes con PV.
 - a. Determinar distribución y presencia de monocitos/macrófagos CD14+ y células dendríticas CD1a+.
 - b. Determinar distribución y presencia de TNF.
3. Analizar *in vitro* la respuesta de monocitos estimulados con KC-A:
 - a. Realizar cultivo de KC.
 - b. Inducir apoptosis de KC.
 - c. Cuantificar producción de TNF en co-cultivos de monocitos y KC-A.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Pacientes y controles

Se incluyeron 5 pacientes, 2 mujeres y 3 hombres, con diagnóstico clínico e histológico de PV. Al momento de la biopsia los pacientes tenían entre 25 y 47 años, habían tenido una evolución de la enfermedad de entre 2 y 12 meses, y ninguno había recibido tratamiento específico al momento de la biopsia (Tabla 1). Como controles se incluyeron 4 voluntarios sanos, de los cuales 3 tenían la misma edad y el mismo género que los pacientes. La biopsia de los controles fue tomada de la misma región que la de los pacientes (Tabla 2). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de México. Todas las personas incluidas en el estudio dieron su consentimiento informado para participar en él.

Tabla 1: Características de los pacientes con PV incluidos en el estudio.

Pacientes	Género	Edad	Tiempo de evolución	Sitio de Inicio	Fenotipo	Inmuno-fluorescencia	Índice de Dsg1 y Dsg3*	Sitio de toma de biopsia
JCMH	M	47	4 meses	Mucosa oral	Mucocutáneo	IgG intercelular	ND	Tórax anterior
JGE	M	46	12 meses	Cara	Mucocutáneo	IgG y C3 intercelular	ND	Espalda
RGC	F	31	4 meses	Mucosa oral	Mucocutáneo	IgG intercelular	ND	Brazo
ISH	M	25	2 meses	Mucosa oral y cuerpo	Mucocutáneo	IgG intercelular	Dsg1- 14 Dsg 3- 103	Hombro
NMS	F	30	5 meses	Axilas	Mucocutáneo	IgG intercelular	Dsg1- 55 Dsg3- 103	Abdomen

* Determinado utilizando MESACUP Dsg1 and Dsg3 ELISA Test System (MBL). Un resultado > 20 es considerado positivo. ND - no determinado.

Tabla 2: Características de los controles sanos incluidos en el estudio.

Controles	Género	Edad	Sitio de toma de biopsia
MCD	F	57	Espalda
EFF	F	30	Brazo
JOR	M	25	Hombro
MCL	F	30	Abdomen

5.2 Biopsias

De cada paciente se obtuvieron dos biopsias, una de piel lesional y otra de piel macroscópicamente perilesional adyacente a la lesión. De los controles solo se obtuvo una biopsia. Las biopsias se obtuvieron mediante sacabocados (punches) de 4 mm de diámetro (Stiefel Laboratories), se incluyeron en compuesto O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura Finetek U.S.A. 4583) y se congelaron a -70°C hasta su uso.

5.3 Inmunohistoquímica (IHQ)

De cada biopsia se realizaron cortes de 7 μm con un criostato (Microm HM 505N) y se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente (Shandon Microscope Slides, Superfrost Plus, Thermo, Ref. 6776214). Los cortes se fijaron en acetona anhidra durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa endógena fue inactivada con Peroxoblock (Zymed, Invitrogen, No. Cat.00-2015) durante 45 segundos. Para anticuerpos primarios hechos en ratón, los sitios inespecíficos se bloquearon con Serum Blocking Solution (Histostain Plus Mouse Primary Aminoetilcarbazol (AEC), Invitrogen, No. Cat. 85-6543) durante 10 minutos. Para el anticuerpo primario hecho en conejo, no biotinilado, el bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con una solución bloqueadora compuesta por D-PBS (por sus siglas en inglés, *Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline*) con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés, *Bovine Serum Albumin*) (PAA,

No. Cat. K41-001) al 2%, Tritón X-100 (Sigma, No. Cat. T8787) al 0.1% y Tween 20 (Sigma, No. Cat. P1379) al 0.05% , durante 60 minutos. Se utilizaron anticuerpos primarios hechos en ratón contra: CD1a (1:50, Clona NA1/34, Dako, No. Cat. M0721), CD4 (1:20, Clona MT310, Dako), CD14 (1:25, Clona TÜK4, Dako, No. Cat. M0825) y TNF (1:300, Clona MAb1, BioLegend, No. Cat. 502802). Se usaron dos anticuerpos primarios contra la forma activa de caspasa-3, uno conjugado con biotina (1:25, BD Pharmingen, No. Cat. 557038) y uno sin conjugar (1:1000, Abcam, No. Cat. ab 13847). Los tejidos con los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche, en cámara húmeda, a 4°C. Para los anticuerpos primarios hechos en ratón, se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado (Histostain Plus Mouse Primary (AEC), Invitrogen, No. Cat. 85-6543) durante 10 minutos. Para el anticuerpo primario hecho en conejo, no biotinilado, se utilizó como secundario un anticuerpo biotinilado cabra anti-conejo ((Biotin (Fab´)2 IgG, 1:300, Zymed, No. Cat. 62-1840) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todas las laminillas fueron entonces incubadas con el conjugado enzimático (Histostain Plus Mouse Primary (AEC), Invitrogen, No. Cat. 85-6543) durante 10 minutos y se revelaron con aminoetilcarbazol (AEC Single Solution Chromogen, Histostain Plus Mouse Primary (AEC), Invitrogen, No. Cat. 85-6543). La contratinción se realizó con hematoxilina acuosa. Para obtener el porcentaje de células positivas, se fotografiaron 15 campos de cada una de las capas de la piel (epidermis, dermis papilar y dermis reticular) con el objetivo de 63x. Cada campo corresponde a 0.27 mm². En cada microfotografía, se contaron todas las células positivas y negativas que se observaron y se calculó el porcentaje de células positivas. En el caso de marcadores membranales como CD1a, CD14 y caspasa 3 activada, las células se consideraron positivas si tenía tanto núcleo como citoplasma y la tinción estaba en el contorno celular.

5.4 TUNEL (Terminal dUTP nick end labeling)

Cortes de tejido de 7 μm fueron fijados con paraformaldehído al 4% en D-PBS PH 7.4, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con D-PBS durante 30 minutos, se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena como se describió para la IHQ. Posteriormente, se incubaron las laminillas 2 minutos en hielo con solución de permeabilización que contiene Tritón X-100 (Sigma, No. Cat. T8787) al 0.1% y citrato de sodio (Sigma, No. Cat. S-4641) al 0.1% en D-PBS. Después de enjuagarlas, las laminillas fueron incubadas con mezcla de reacción de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit Peroxidase (POD), Roche, No. Cat. 11684817910), compuesta por 5 μl de enzima y 45 μl de nucleótidos marcados, durante 60 minutos a 37°C en cámara húmeda. Las laminillas se lavaron y fueron incubadas 30 minutos con convertidor de peroxidasa (POD Converter, In Situ Cell Death Detection Kit POD, Roche, No. Cat. 11684817910) bajo las mismas condiciones. Las laminillas fueron reveladas y contrateñidas como se describió para IHQ. En el caso de TUNEL, las células eran consideradas positivas si tenían núcleo y citoplasma y la tinción era nuclear.

5.5 Dobles tinciones

Las dobles tinciones se realizaron en cortes de tejido de 4 μm . Los cortes fueron fijados con paraformaldehído al 2% en D-PBS pH 7.4. A continuación se realizó TUNEL como se describió previamente, con una excepción. El revelador o cromógeno que se utilizó fue diaminobencidina (DAB Substrate, Roche, No. Cat. 11 718 096 001) en lugar de AEC. Una vez revelado el TUNEL, se realizó IHQ con los reactivos del kit Histostain Plus Mouse Primary (AEC) (Invitrogen, No. Cat. 85-6543) siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado. Posteriormente se agregó el complejo enzimático con fosfatasa alcalina (AP) ABCComplex/AP (Dako, No, Cat. K 0376) durante 30 minutos. La fosfatasa alcalina se reveló con el kit AP Red Substrate (Zymed,

No. Cat. 00-2203) más levamisol (Zymed, No. Cat. 00-2205) para bloquear la actividad endógena de fosfatasa alcalina. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina acuosa.

5.6 Cultivo de 3T3 y KC

Fibroblastos 3T3, que fueron utilizados como células nodrizas para el cultivo de KC, fueron cultivados con DMEM (GIBCO, No. Cat. 31600-026) más 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, No. Cat. 26140-079) a 37°C con 5% de CO₂. Para volverlos post-mitóticos se incubaron 4 horas con Mitomicina C 8 µg/ml (Sigma Aldrich, No. Cat. M0503) a 37°C con 5% de CO₂. Se enjuagaron varias veces con D-PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺ y se dejaron con DMEM más 10% SFB durante 24 horas, a 37°C con 5% de CO₂, antes de ser utilizados.

El cultivo de KC humanos se realizó a partir de la vaina radicular externa del pelo, siguiendo la técnica de Limat y Hunziker [97]. La única variación fue la sustitución de fibroblastos dérmicos por 3T3. Brevemente, para cada cultivo se recolectaron 15-20 pelos, con raíz, de voluntarios sanos. En un estereomicroscopio, con un bisturí, se cortó el extremo del pelo que tenía la raíz y se desechó el resto del pelo. Los bulbos pilosos así obtenidos se lavaron mediante pipeteo vigoroso con DMEM más 10% SFB. Luego se incubaron con tripsina (GIBCO, No. Cat. 15090046) 0.1% /EDTA (Baker, No. Cat. 8991-01) 0.02%, durante 18 minutos a 37°C, para desprender las células de la vaina radicular externa. La tripsina se neutralizó con medio primario para KC que contiene 3 partes de DMEM y 1 parte de Ham F12 (Cambrex, No. Cat. 12-615-F), 10% SFB, penicilina 100 U/ml/estreptomicina 100 µg/ml (GIBCO, No. Cat. 15070-063), adenina (Sigma Aldrich, No. Cat. A-2786) 0.135 mM, insulina (Novolin R, Novo-Nordisk) 5 µg/ml, triiodotironina (Sigma Aldrich, No. Cat. T-2877) 4 nM, hidrocortisona (Sigma Aldrich, No. Cat. H-4001) 0.4 µg/ml. Los bulbos pilosos fueron pipeteados varias veces para

desprender las células. Éstas fueron sembradas en 5 cajas de 35 mm con una monocapa de fibroblastos 3T3 post-mitóticos (20 000 3T3/ml) con medio primario para KC, a 37°C con 5% de CO₂. Siete días después se cambió el medio de cultivo a medio final para KC que consiste en medio primario para KC más factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés, *Epidermal Growth Factor*) (Sigma Aldrich, No. Cat. E-4127) 10 ng/ml, toxina del cólera (Sigma Aldrich, No. Cat. C-8052) 84 ng/ml, anfotericina B (GIBCO, No. Cat. 15290018) 0.25 µg/ml y L-glutamina (GIBCO, No. Cat. 25030-081) 2 mM. Se les hizo cambio parcial de medio cada tercer día durante 7-10 días, hasta que los KC pudieran ser subcultivados sin células nodrizas. Los KC se subcultivaron en 2 medios diferentes, uno que permitiera obtener células apoptóticas y el otro que permitiera obtener células vivas o necróticas. Los KC a los que se les iba a inducir apoptosis se subcultivaron en Defined Keratinocyte Serum Free Medium (D-KC-SFM) (GIBCO, No. Cat. 10744-019), que está suplementado con factores de crecimiento recombinantes. Los KC que se iban a ocupar como controles vivos o necróticos se subcultivaron en Keratinocyte Serum Free Medium (KC-SFM) (GIBCO, No. Cat. 17005-042), que está suplementado con extracto de hipófisis bovina y EGF.

5.7 Separación y cultivo de monocitos de sangre periférica

Para la separación de monocitos se obtuvieron “buffy coats” de donadores de sangre sanos. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron mediante un gradiente de Histopaque (Sigma Aldrich, No. Cat. 10771). En cajas petri de vidrio de 20 cm se sembraron 100-150 millones de células con RPMI 10% SFB y se dejaron adherir durante 90 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Los mononucleares no adherentes se quitaron mediante cuatro lavados con D-PBS a temperatura ambiente. Las células adherentes se incubaron durante 15 minutos con EDTA (Baker, No. Cat. 8991-01) 5 mM en D-PBS 50% / RPMI 50%, a 4°C y se desprendieron con un policia de caucho. Se centrifugaron a 400 X

g, 10 minutos, a 4°C y se sembraron 7×10^5 células en placas de 24 pozos con RPMI (GIBCO, No. Cat. 31800-014) más 10% SFB. Se dejaron reposar 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ antes de usarlos.

Para determinar la pureza de los monocitos, se incubaron 10^6 células por condición. Se incluyeron tres condiciones: sin teñir, teñidas con un anticuerpo contra CD14 acoplado a ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés, *Phycoerythrin*) y teñidas con el control de isotipo correspondiente. Las células fueron teñidas incubándolas con anti-CD14PE (BD Pharmingen, No. Cat. 555398) o control de isotipo (BD Pharmingen, No. Cat. 555749) 1:25, durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas con D-PBS, centrifugadas a $400 \times g$, 10 minutos, a 4°C y resuspendidas en 500 µl de D-PBS. Se analizaron en un citómetro de flujo FACSsort (BD Biosciences) y se registraron 10^4 eventos.

5.8 Inducción de apoptosis y necrosis de KC

Para inducirles apoptosis, los KC que habían sido cultivados en D-KC-SFM y se encontraban en el día 13 desde el subcultivo, fueron tratados con camptotecina (Sigma Aldrich, No. Cat. C9911) 5 µM en medio fresco, por 72 horas a 37°C con 5% de CO₂. Tras recolectar el sobrenadante, las células que aún se encontraban adheridas fueron incubadas con tripsina 0.1%/ EDTA 0.02%, a 37°C por 9 minutos, y se desprendieron por pipeteo. Células y sobrenadante se combinaron y se centrifugaron a $260 \times g$ a 4° C por 10 minutos. Para obtener KC vivos (KC-V), a los KC que habían sido cultivados en KC-SFM y se encontraban en el día 13 desde el subcultivo, se les hizo cambio completo de medio y se dejaron durante 72 horas más a 37° C con 5% de CO₂. A las 72 horas se desechó el sobrenadante, las células fueron desprendidas y recolectadas como se especificó arriba. La mitad de las células cultivadas con KC-SFM se sometieron a 3 ciclos

de congelación/descongelación para inducirles necrosis. Las células apoptóticas, necróticas o vivas así obtenidas se emplearon después para ensayos con anexina V-FITC/Ioduro de propidio (IP) o para co-cultivos de monocitos/KC. Para determinar si las células estaban vivas, apoptóticas o necróticas, se realizó un ensayo de anexina V-FITC/IP. 10^5 KC se incubaron en un buffer de HEPES-calcio (HEPES-NaOH 10 mM pH7.4, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM) con anexina-V-FITC (BD Pharmingen, No. Cat. 556419) 1:25 y IP 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich, No. Cat. P4170), durante 15 minutos, en la oscuridad, a temperatura ambiente. Las células se colocaron en hielo y se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo FACSort. Se registraron 10^4 eventos.

5.9 Marcaje de KC con CFSE y ensayo de fagocitosis

Cuatro días antes del co-cultivo de monocitos y KC, se marcaron los KC con CFSE (por sus siglas en inglés, *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*). Los KC se desprendieron y se centrifugaron como se describió previamente. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio correspondiente, ya sea D-KC-SFM o KC-SFM, con CFSE 10 μM (Molecular Probes, No. Cat. C1157). Se incubaron durante 10 minutos a 37°C en la oscuridad, y luego se lavaron 3 veces con 10 ml de medio de cultivo frío. Se sembraron en botellas de 75 cm con el medio de cultivo correspondiente y se colocaron en la incubadora a 37°C con 5% de CO_2 , protegidas de la luz. Al siguiente día, se les hizo cambio de medio de cultivo total y a aquellos KC cultivados en D-KC-SFM, también se les agregó camptotecina 5 μM . La inducción de apoptosis y necrosis de los KC se llevó a cabo como se describió previamente.

Para el ensayo de fagocitosis, monocitos purificados previamente fueron co-cultivados con KC-V, KC-A y KC-N marcados con CFSE, en una relación 1:1, en cajas de 24 pozos protegidas de la luz. El co-cultivo se dejó 3 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Los

sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y las células restantes se incubaron con EDTA 5 mM a 4°C por 15 minutos y se desprendieron por pipeteo. Las células se centrifugaron a 360 X g, 10 minutos a 4°C, se resuspendieron en D-PBS y se incubaron con anti-CD14PE (BD Pharmingen, No. Cat. 555398) 1:25 durante 15 minutos, en la oscuridad. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSsort y se registraron 10⁴ eventos. Las células restantes se examinaron posteriormente en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager M1 (Zeiss) y se fotografiaron con una cámara AxioCam MR c5 (Zeiss).

5.10 Co-cultivo de monocitos y KC para determinación de TNF

Para analizar la producción de TNF, monocitos purificados previamente fueron co-cultivados con KC-V, KC-A o KC necróticos (KC-N), o bien con esferas de poliestireno en una relación 7:1, 5:1, 1:1 ó 1:2, respectivamente, en placas de 24 pozos. Como controles, ambas células fueron cultivadas solas y monocitos también fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS) 10 ng/ml. Los cultivos se colocaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 horas. Posteriormente se retiraron los sobrenadantes, se centrifugaron a 360 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se almacenaron a -70°C hasta su uso. La concentración de TNF en los sobrenadantes se determinó mediante ELISA sandwich. En una placa de 96 pozos de alta unión y de fondo plano (Costar, Corning Incorporated, No. Cat. 3590) se colocaron 50 µl por pozo de anticuerpo de captura diluido en buffer de fosfato dibásico de sodio 0.1M a pH 9. El anticuerpo de captura para TNF (BD Pharmingen, No. Cat. 551220) se utilizó a una concentración de 4 µg/ml. La placa con el anticuerpo de captura se tapó y se dejó a 4°C durante toda la noche. Se lavó la placa 4 veces con una solución de PBS con Tween 80 (Sigma Aldrich, No. Cat. P1754) 0.01% en un lavador de placas de ELISA (Autostrip Washer ELx50, Bio-Tek Instruments). Para bloquear la placa se agregaron 200 µl por pozo de solución bloqueadora y se incubó 30

minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces, se colocaron 100 μ l por pozo de la curva de concentración estándar y de los sobrenadantes y se incubó la placa 2 horas a temperatura ambiente. El TNF recombinante que se utilizó fue de BD Pharmingen, No. Cat. 554618 y las concentraciones que se utilizaron para la curva estándar fueron de 10 a 200 μ g/ml. Se lavó la placa 4 veces, se agregaron 100 μ l de anticuerpo de detección (BD Pharmingen, No. Cat. 554511) diluído en BSA al 1% con 0.05% de Tween 20 a una concentración de 0.5 μ g/ml y se dejó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa 6 veces, se colocaron 100 μ l por pozo del complejo estreptavidina-AP (Invitrogen, No. Cat. 19542-018) diluído 1:2000 en BSA al 1% con 0.05% de Tween 20 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa 8 veces y a cada pozo se le agregaron 100 μ l de solución reveladora, compuesta por buffer sustrato y sustrato de fosfatasa a 5 μ g/ml y se dejó en la oscuridad durante 30 minutos para TNF. La lectura se realizó a 405 nm en un lector de ELISA (μ Quant, Bio-Tek) y las concentraciones de las citocinas se obtuvieron mediante el programa KC4.

5.11 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante el programa de estadística Minitab 15. Dado que el número de biopsias fue pequeño y no se puede asumir una distribución normal, en las gráficas de las biopsias se presenta la mediana. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando había diferencias entre los grupos, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Un valor de P menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Para los resultados *in vitro* se aplicó ANOVA de una vía seguida de la prueba de rangos de Tukey en caso de encontrarse diferencias entre los grupos. Un valor de P menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Abundante apoptosis en la piel de pacientes con PV

Era importante determinar si la apoptosis es un componente relevante de las lesiones de PV. En este estudio se incluyeron cinco pacientes con PV activo, con una evolución de la enfermedad de 2 a 12 meses, que no habían recibido tratamiento previo. De cada paciente se obtuvieron dos biopsias, una de piel macroscópicamente lesional y otra de piel macroscópicamente perilesional. De los controles se obtuvo una sola biopsia de piel sana. La presencia de muerte celular en las biopsias de piel se determinó mediante TUNEL y se corroboró con IHQ para caspasa 3 activada. En la epidermis lesional y perilesional de pacientes con PV se observó un incremento notable de células positivas para TUNEL en comparación con la epidermis de los controles (Fig. 3A, arriba). Para obtener el porcentaje de células positivas en la epidermis, se fotografiaron 15 campos de epidermis con el objetivo de 63x y se contaron todas las células, tanto negativas como positivas, para cada persona incluida en el estudio. El 62.8% (rango 46-64.6%) y 54.9% (rango 39.9-56.6%) de células fueron positivas para TUNEL en epidermis lesional y perilesional, respectivamente, en comparación con 2.4% (rango 1.03-3.9%) de células positivas en epidermis control (Fig. 3B). La técnica de TUNEL no es apropiada como marcador específico de apoptosis, ya que puede detectar tanto células apoptóticas como necróticas. Por esa razón, se decidió corroborar los hallazgos mediante IHQ, utilizando un anticuerpo contra caspasa 3 activada. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con TUNEL. Tanto en epidermis lesional como perilesional se observó un incremento en la cantidad de células teñidas, en comparación con la epidermis control (Fig. 3A, abajo). 56.6% (rango 42.9-71%) de células en la epidermis lesional y 53.3% (rango 48.5-57%) en la perilesional fueron positivas para caspasa 3 activada, mientras que en la epidermis control solo el 3% (rango 2.1-4.9%) fueron positivas (Fig. 3B). La diferencia entre la apoptosis presente en la epidermis de pacientes (tanto lesional como perilesional) y

controles fue estadísticamente significativa, tanto con TUNEL como con IHQ contra caspasa 3 activada. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre la apoptosis presente en la epidermis lesional y la perilesional (Fig. 3B). Es importante mencionar que aunque macroscópicamente la piel perilesional parecía no tener lesiones, encontramos que microscópicamente, 3 de 5 biopsias perilesionales presentaron acantólisis. Aun así, el porcentaje de células apoptóticas en esas 2 biopsias sin acantólisis no fue menor que en las otras 3. En la epidermis lesional y perilesional, las células apoptóticas estaban presentes en todas las capas de la epidermis, no solo en áreas de acantólisis, sino también en áreas cohesivas.

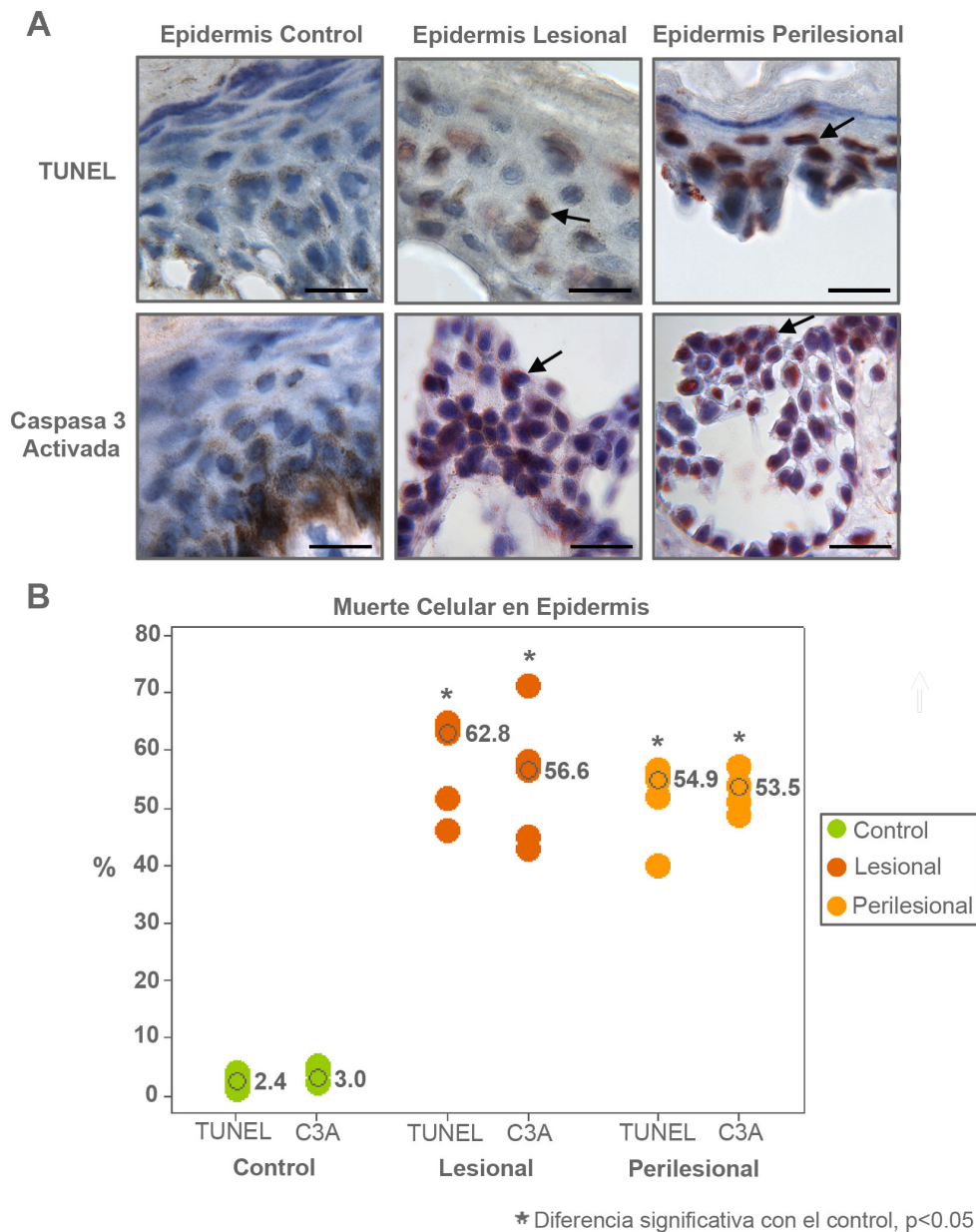


Fig. 3: Incremento de células apoptóticas en epidermis de pacientes con PV. (A) Fotomicrografía de epidermis control (columna izquierda), epidermis con lesión (columna central) y perilesional (columna derecha). Células positivas para TUNEL (fila superior) y para caspasa 3 activada (fila inferior) están presentes en epidermis con lesión y perilesional de pacientes con PV, pero no en epidermis de controles sanos. Barra: 20 μ m. (B) Los porcentajes de células positivas para TUNEL (TUNEL) y para caspasa 3 activada (C3A) son significativamente mayores en epidermis lesional y perilesional de pacientes con PV que en epidermis de controles sanos. O - mediana. * Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$.

Un hallazgo que nos llamó la atención fue que la apoptosis no se limitaba a la epidermis en PV. También en la dermis de los pacientes con PV había abundante muerte celular detectable mediante TUNEL e IHQ contra caspasa 3 activada. (Fig. 4 A). Para determinar si la muerte celular ocurría diferencialmente en dermis papilar y reticular, se contaron 15 microfotografías de dermis papilar y 15 de dermis reticular para cada persona. En la dermis papilar lesional y perilesional, 59.3% (rango 40.1-65.2%) y 53.3% (rango 49-60.2%) de células, respectivamente, fueron positivas para TUNEL, mientras que 47.2% (rango 28.9-55%) y 50.5% (rango 34.3-60.1%), en el mismo orden, fueron positivas para caspasa 3 activada (Fig. 4B, izquierda). Esto contrasta con 4.3% (rango 2.3-4.8%) de células positivas para TUNEL y 4.2% (rango 3.7-6%) para caspasa 3 activada en dermis papilar de controles sanos (Fig. 4B, izquierda). Los resultados no fueron muy diferentes en la dermis reticular. 50.8% (rango 32.6-63.6%) y 52% (rango 47.1-62.5%) de células en dermis reticular lesional y perilesional, respectivamente, fueron positivas para TUNEL, mientras que 43.2% (rango 32.8-58.4%) y 48% (rango 33.3-56.8%) de células, en el mismo orden, fueron positivas para caspasa 3 activada (Fig. 4B, derecha). En la dermis reticular de controles sanos, solo 6.6% (rango 5.9-7.4%) de células fueron positivas para TUNEL y 5.4% (rango 4.1-6.5%) lo fueron para caspasa 3 activada (Fig. 4B, derecha). La diferencia entre la dermis papilar y reticular de pacientes, tanto lesional como perilesional, fue significativamente diferente a la de los controles, mediante TUNEL e IHQ contra caspasa 3 activada (Fig. 4B). Sin embargo, como ocurrió en epidermis, no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de muerte celular entre dermis lesional y perilesional. Tampoco se encontró diferencia entre aquellas biopsias con y sin acantólisis.

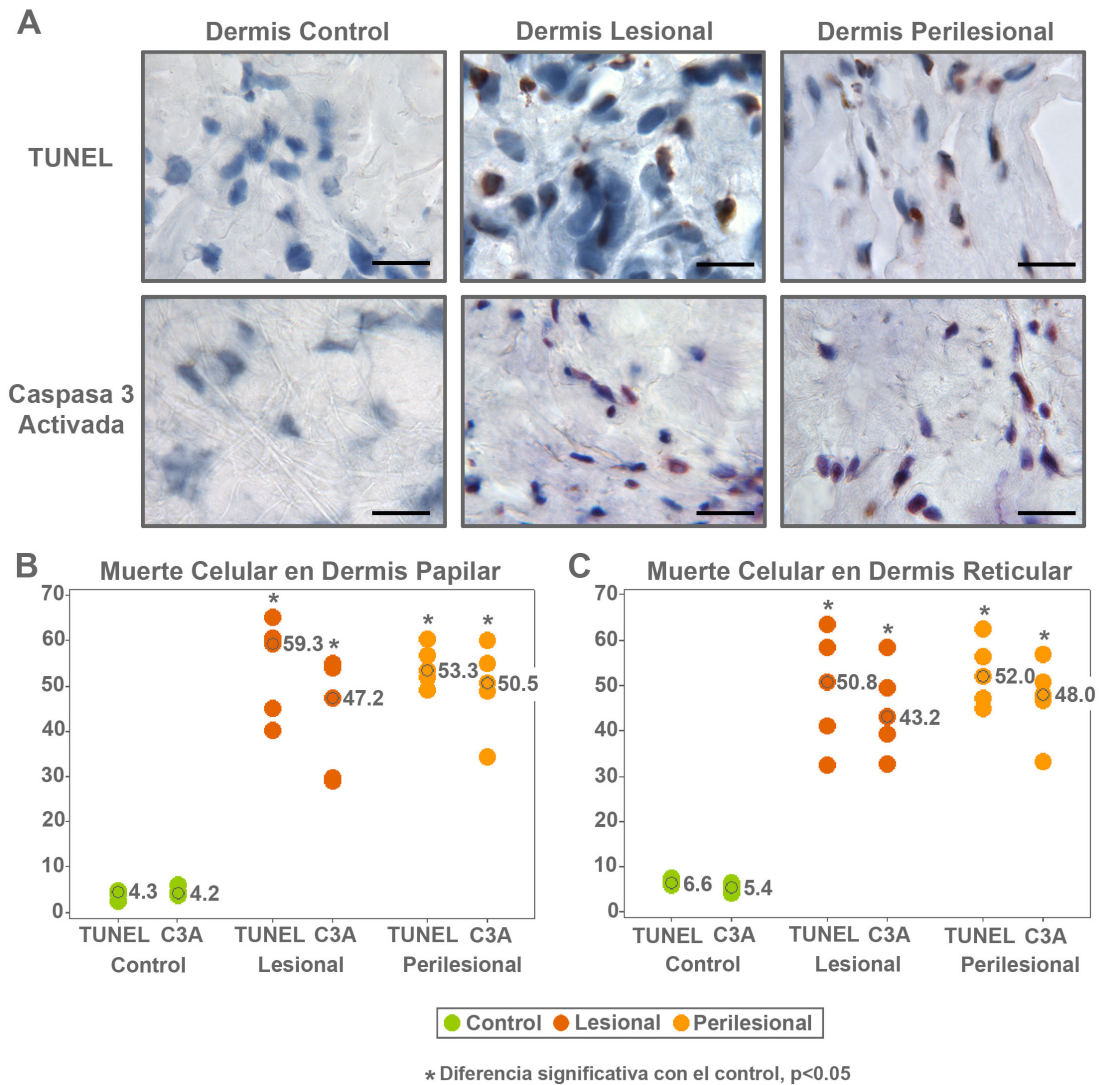


Fig. 4: Incremento de células apoptóticas en dermis de pacientes con PV. (A) Fotomicrografía de dermis control (columna izquierda), dermis con lesión (columna central) y perilesional (columna derecha). Células positivas para TUNEL (fila superior) y para caspasa 3 activada (fila inferior) están presentes en dermis con lesión y perilesional de pacientes con PV, pero no en dermis de controles sanos. Barra: 20 μ m. (B) Los porcentajes de células positivas para TUNEL (TUNEL) y para caspasa 3 activada (C3A) son significativamente mayores en dermis lesional y perilesional de pacientes con PV que en dermis de controles sanos. O - mediana. * Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$.

6.2 Células del sistema fagocítico mononuclear en la piel de pacientes con PV

Las células apoptóticas son capaces de producir señales quimiotácticas para atraer fagocitos [98] y favorecer su remoción. Con tal acumulación de células apoptóticas en la

piel de los pacientes con PV esperábamos encontrar células del sistema fagocítico mononuclear infiltrando tanto epidermis como dermis. Buscamos células dendríticas CD1a+ y monocitos/macrófagos CD14+ en biopsias lesionales y perilesionales de pacientes con PV y de controles sanos.

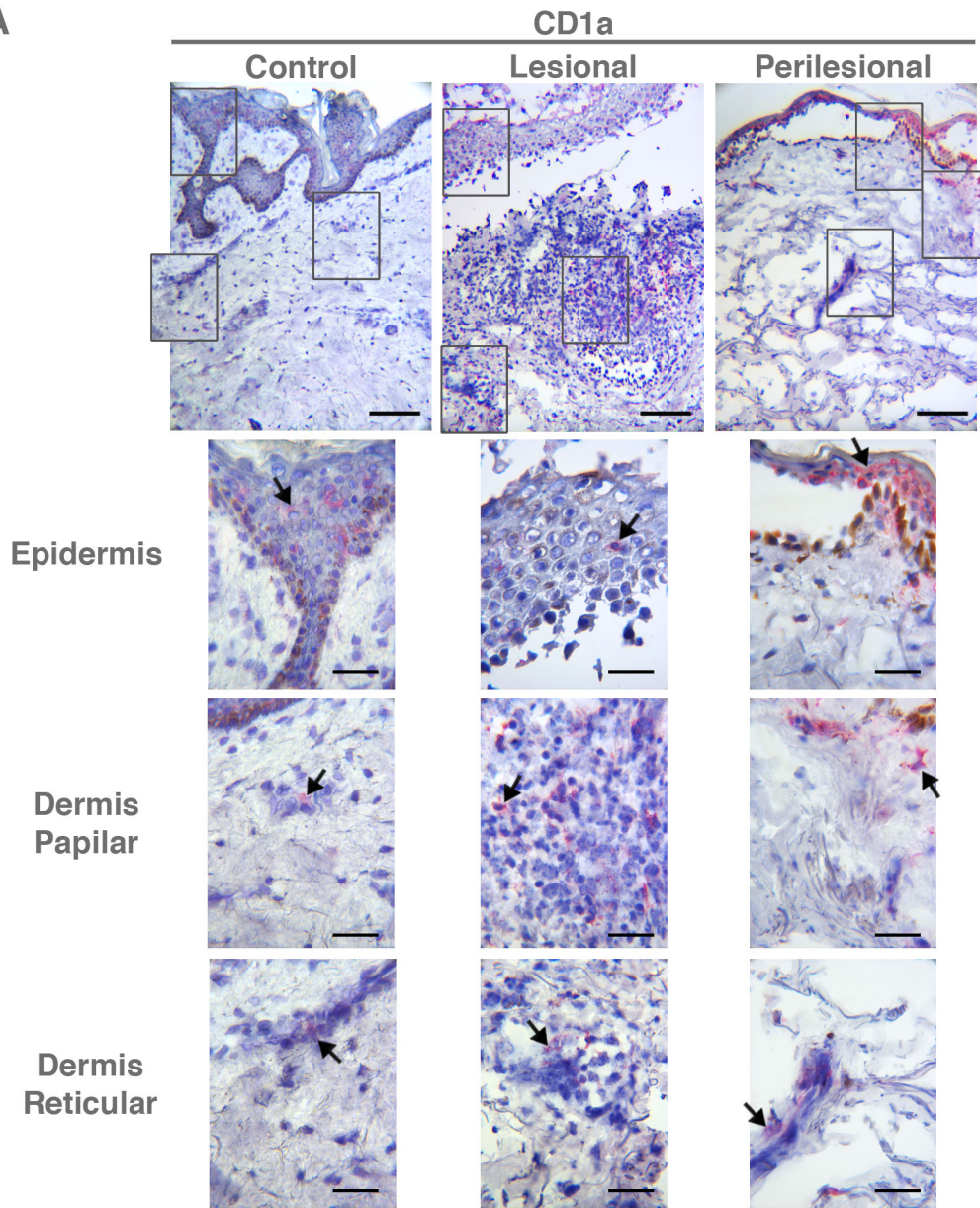
6.2.1 CD1a+

En la epidermis lesional, se detectaron pocas células CD1a+ y estaban distribuidas por todas las capas epidérmicas. En la epidermis perilesional, las células CD1a+ se encontraron principalmente en la capa basal y en la parte inferior de la capa espinosa, aunque algunas células CD1a+ se observaron en la parte superior de la capa espinosa y en la capa granular. En los controles, la distribución de células CD1a+ fue similar a la de la epidermis perilesional.

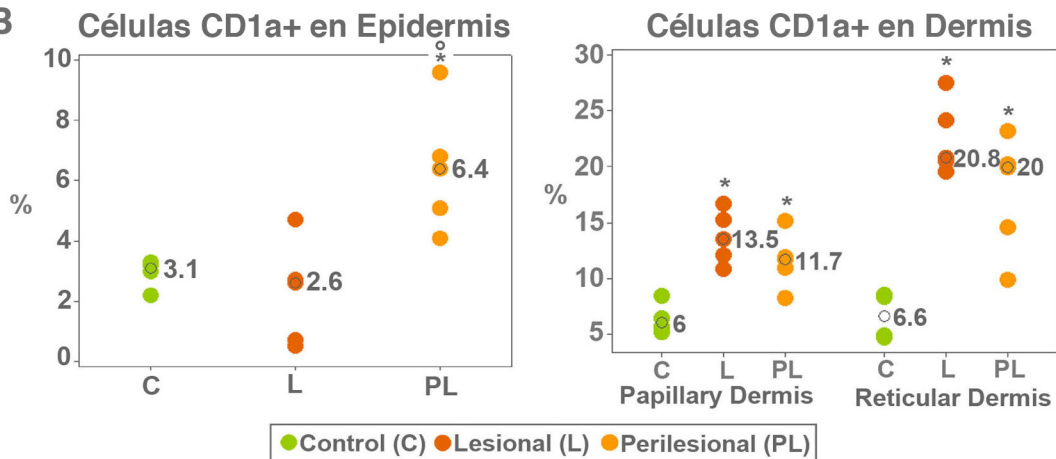
En dermis papilar lesional y perilesional, la mayoría de las células CD1a+ se encontraban inmediatamente por debajo de la epidermis formando grupos de células alrededor de vasos y, menos frecuentemente se observaban como células individuales. En dermis reticular lesional, las células CD1a+ se veían con la misma frecuencia aisladas que formando grupos. En la dermis reticular perilesional la mayoría de las células estaban esparcidas y solo unas pocas se veían formando grupos. En lo que se refiere a anexos cutáneos de la dermis lesional, las células CD1a+ se observaban frecuentemente tanto en folículos pilosos como en glándulas, mientras que en la dermis perilesional, esto no era tan frecuente y la mayoría de las células CD1a+ estaba en folículos pilosos. En dermis papilar y reticular control, las células CD1a+ estaban principalmente formando grupos con otras células. Se encontraban frecuentemente alrededor de vasos y en apéndices tanto en folículos pilosos como en glándulas.

Además de su localización microanatómica, también fue analizado el porcentaje de células CD1a+. Las células CD1a+ estuvieron incrementadas no solo en epidermis perilesional, sino en dermis lesional y perilesional (Fig. 5A). En la piel perilesional encontramos los siguientes porcentajes de células CD1a+ en comparación con la piel control: 6.4% vs 3.1% en epidermis, 11.7% vs 6% en dermis papilar y 20% vs 6.6% en dermis reticular (Fig. 5B). En piel lesional, el porcentaje de células CD1a+ en epidermis tendió a ser menor que aquel de epidermis control (2.6% vs 3.1%), aunque la diferencia no fue significativa. Cuando analizamos la dermis lesional encontramos que el porcentaje de células CD1a+ estaba significativamente incrementado en comparación con la dermis control: 13.5% vs 6% en la dermis papilar y 20.8% vs 6.6% en la dermis reticular (Fig. 5B).

A



B



* Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$

○ Diferencia significativa con epidermis lesional, $p < 0.05$

Fig. 5: Distribución y proporción de células CD1a+ en epidermis y dermis de pacientes con PV. (A) En cortes de piel control (izquierda), con lesión (centro) y perilesional (derecha) se realizó IHQ para CD1a. Las fotomicrografías muestran más células CD1a+ en epidermis perilesional que en aquella con lesión y que en la epidermis de controles sanos. También se ve un número mayor de células CD1a+ en dermis (papilar y reticular) con lesión y perilesional de pacientes con PV en comparación con dermis (papilar y reticular) de controles sanos. (B) El porcentaje de células CD1a+ es significativamente mayor en epidermis perilesional que en aquella con lesión y que en epidermis de controles sanos (gráfica superior). El porcentaje de células CD1a+ está elevado significativamente en dermis papilar con lesión y perilesional (gráfica inferior, izquierda) así como en dermis reticular con lesión y perilesional (gráfica inferior, derecha), en comparación con la dermis papilar y reticular de controles sanos. C- control, L- con lesión, PL- perilesional, O - mediana. Barra de microfotografía panorámica: 100 μ m, barra de los acercamientos: 30 μ m. * Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$.

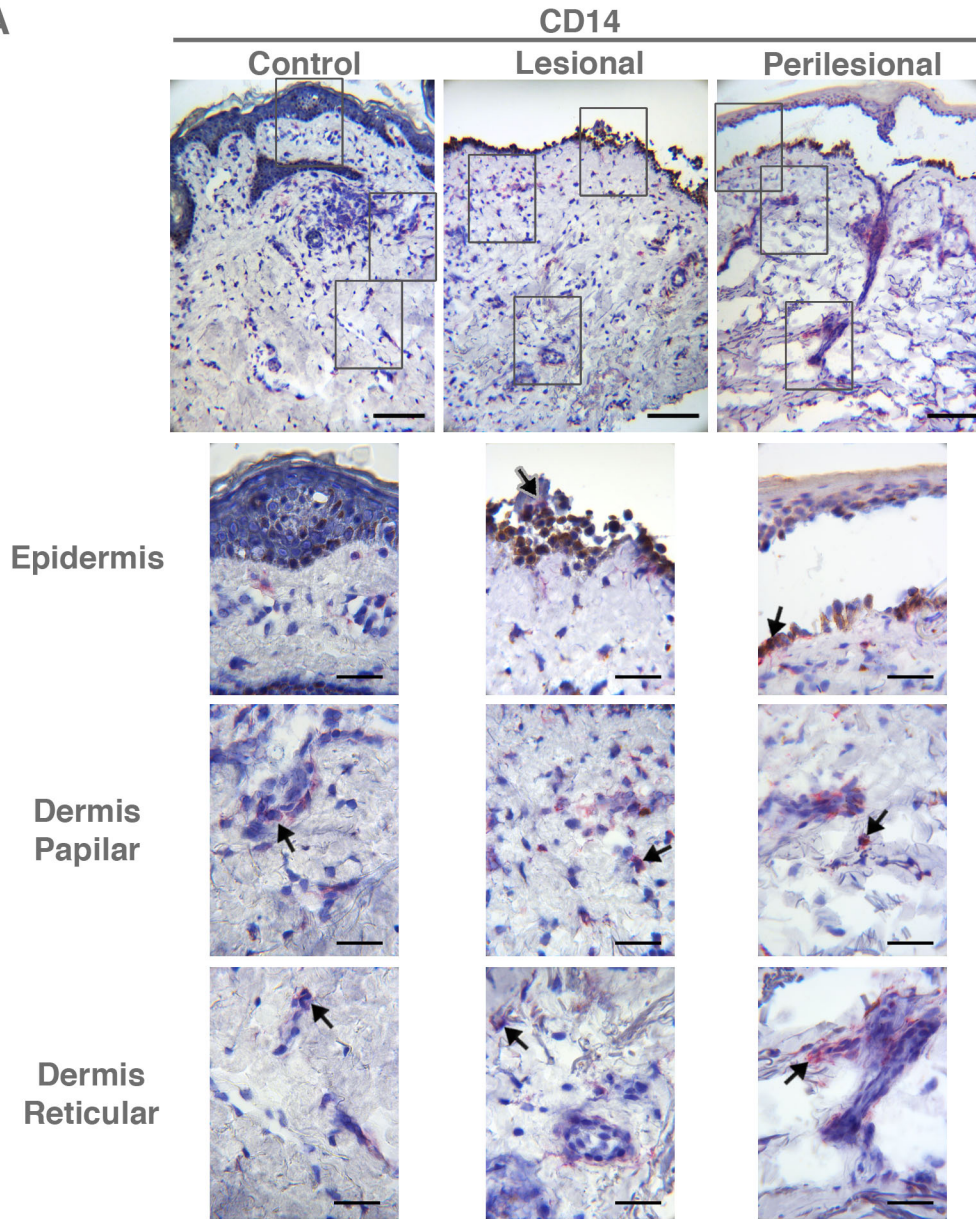
6.2.2 CD14+

Tanto en epidermis lesional como perilesional se encontraron células CD14+ esparcidas por todas las capas, incluyendo la capa basal. En cambio, en la epidermis control se identificaron pocas células CD14+ y todas localizadas en la capa basal.

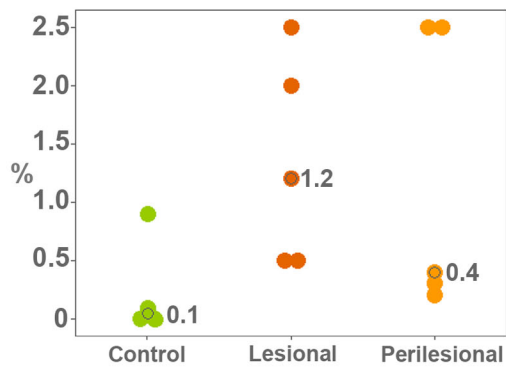
En la dermis papilar lesional y perilesional, las células CD14+ se encontraban formando parte de infiltrados inflamatorios y alrededor de vasos, solo unas pocas estaban en anexos y aisladas. En la dermis reticular lesional y perilesional, la mayoría estaban aisladas pero unas cuantas estaban formando grupos en unidades dérmicas y en apéndices (Fig. 6A). En la dermis papilar control, la mayoría de las células CD14+ se observaron alrededor de vasos y en anexos, especialmente glándulas (Fig. 6A), sólo unas pocas células se encontraban aisladas, mientras que en la dermis reticular control la mayoría de las células CD14+ tendían a estar solas, no en grupos.

En epidermis lesional y perilesional, las células CD14+ solo mostraron un leve incremento, sin embargo, en dermis lesional y perilesional el aumento fue mayor (Fig. 6A). En comparación con la epidermis control (0.1%) el porcentaje de células CD14+ tendió a incrementar en la epidermis lesional (1.2%) y perilesional (0.4%), sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 6B, izquierda). En dermis, sin embargo, sí se observó una diferencia significativa entre dermis papilar perilesional y dermis control (17.9% vs 6.6%) (Fig. 6B, derecha) y una tendencia a la alta se observó en dermis papilar lesional en comparación con la dermis control (10.6% vs 6.6%) Al analizar la dermis reticular se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la dermis lesional (16.1%) y perilesional (22%), con la dermis reticular control (6.9%) (Fig. 6B, derecha). No se encontraron diferencias significativas entre la piel lesional y perilesional, aunque el porcentaje de células CD14+ tendió a ser mayor en la dermis papilar y reticular perilesional que en las mismas capas lesionales (Fig. 6B, derecha).

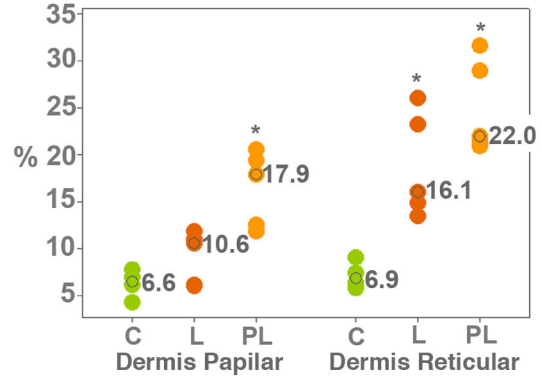
A



B Células CD14+ en Epidermis



Células CD14+ en Dermis



● Control (C) ● Lesional (L) ● Perilesional (PL)

* Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$

Fig. 6: Distribución y proporción de células CD14+ en epidermis y dermis de pacientes con PV. (A) En cortes de piel control (izquierda), con lesión (centro) y perilesional (derecha) se realizó IHQ para CD14. Las fotomicrografías muestran una mayor tinción para CD14 en dermis con lesión y perilesional (papilar y reticular) de pacientes con PV en comparación con dermis (papilar y reticular) de controles sanos. (B) El porcentaje de células CD14+ tiende a ser mayor en epidermis con lesión y perilesional que en aquella de controles sanos (gráfica superior). El porcentaje de células CD14+ está elevado significativamente en dermis papilar perilesional (gráfica inferior, izquierda) así como en dermis reticular con lesión y perilesional (gráfica inferior, derecha), en comparación con dermis papilar y reticular de controles sanos. C- control, L- con lesión, PL- perilesional, O - mediana. Barra de microfotografía panorámica: 100 μ m, barra de los acercamientos: 30 μ m. * Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$.

6.3 Las células dérmicas apoptóticas incluyen células dendríticas CD1a+, monocitos/macrófagos CD14+ y linfocitos CD4+

Es posible que la razón por la cual no muchas células CD14+ llegan a la epidermis y células CD1a+ no incrementan en la epidermis lesional, sea que están muriendo por apoptosis en la dermis o están siendo reclutadas a la dermis por otras células apoptóticas. Por esa causa se decidió determinar si leucocitos estaban formando parte del infiltrado apoptótico en la dermis. Con los resultados previos y mediante análisis por IHQ de las poblaciones de células CD8+, CD56+ y CD4+ (no se muestra), encontramos que los linajes más abundantes de células en la piel de pacientes con PV eran linfocitos T CD4+ ayudadores, células dendríticas CD1a+ y monocitos/macrófagos CD14+. Los linfocitos CD8+ y las células NK CD56+, aunque incrementadas tanto en piel lesional como perilesional de pacientes con PV en comparación con la de los controles (no se muestra) contribuyen con menos de 15% al infiltrado inflamatorio total. Como no es un gran porcentaje, decidimos enfocarnos a los linajes más comunes. Se realizó una doble tinción con TUNEL y alguno de los siguientes marcadores celulares: CD1a, CD4 o CD14. En la dermis perilesional, muchas células fueron positivas para TUNEL y, de estas, algunas

eran también CD1a+, muchas eran CD4+ y también algunas eran CD14+ (Fig. 7 arriba). En la dermis lesional, una gran proporción de células fueron también positivas para TUNEL y muchas de ellas fueron también positivas para CD1a+, CD4+ o CD14+ (Fig. 7 abajo). Tanto en dermis lesional como perilesional, se detectaron células negativas para TUNEL que eran positivas para CD1a, CD4 o CD14 (Fig. 7), lo que indica que aun estaban vivas al momento que se tomó la biopsia. Entonces, muchas de las células apoptóticas presentes en la dermis de los pacientes con PV pertenecen a los linajes CD1a, CD4 y CD14, pero otras células inflamatorias también pueden estar involucradas. Es importante mencionar que varias de las células CD1a+, CD4+ y CD14+ continúan vivas, y por lo tanto, funcionales.

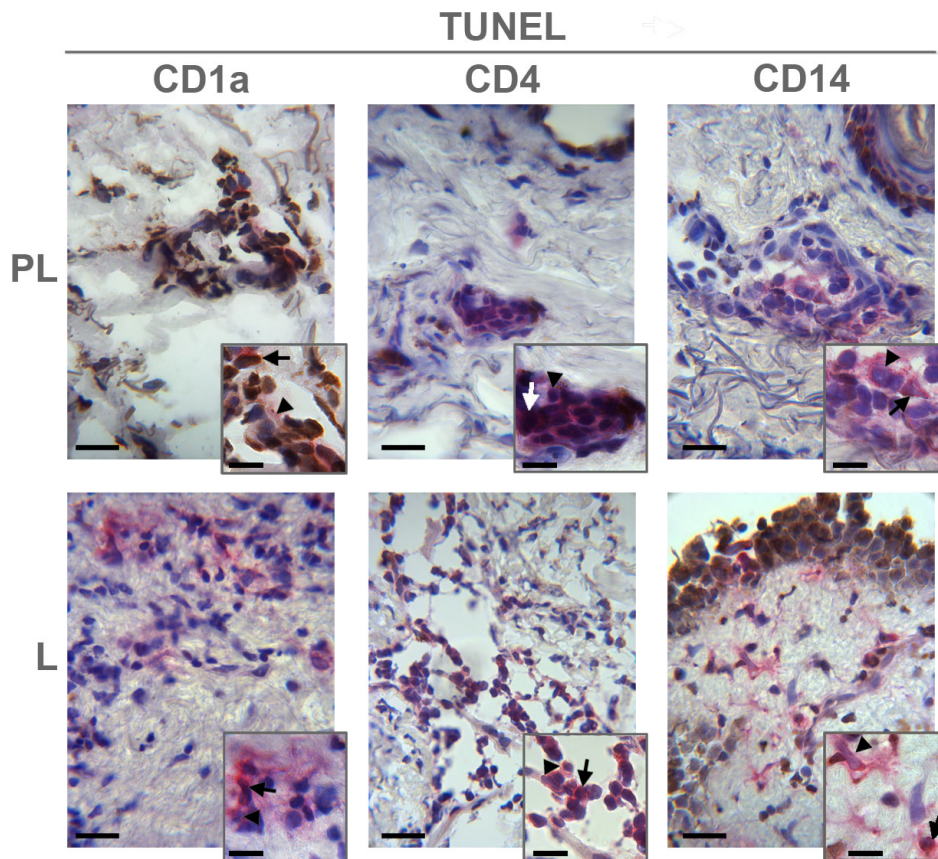


Fig. 7: Entre las células dérmicas apoptóticas se encuentran células dendríticas CD1a+, monocitos/macrófagos CD14+ y linfocitos CD4+. Cortes de piel perilesional (fila superior) y con lesión (fila inferior) de pacientes con PV fueron sometidos a una doble tinción con TUNEL y uno de los siguientes marcadores: CD1a (izquierda), CD4 (centro) o CD14 (derecha). Las fotomicrografías muestran células positivas para CD1a, CD4 y CD14 tanto vivas (cabeza de flecha) como apoptóticas (flechas). Barra de microfotografía principal: 20 µm, barra del acercamiento: 10 µm. PL- perilesional, L- con lesión.

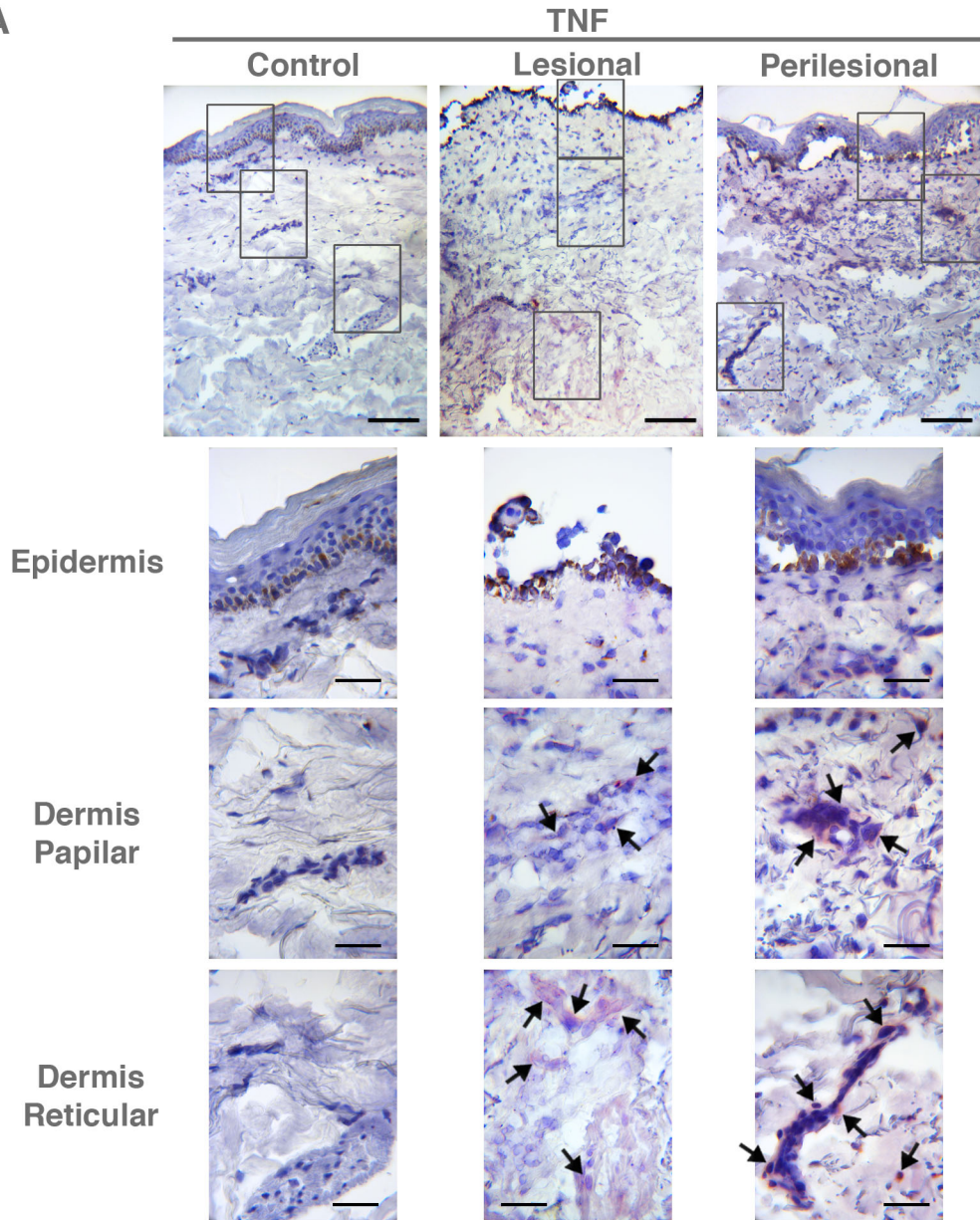
6.4 TNF está incrementado en la dermis de pacientes con PV

Dado que el exceso de células apoptóticas en la piel de pacientes con PV era evidente, se decidió buscar la presencia de TNF por IHQ en tejido lesional, perilesional y control (Fig. 8). En la epidermis lesional encontramos células positivas predominantemente en dos de los cinco pacientes. Uno tenía una tinción fuerte en un área no acantolítica y algunas células positivas en la capa basal. El otro mostró tinción en células acantolíticas. En la epidermis perilesional encontramos positividad en dos pacientes también. Uno tenía

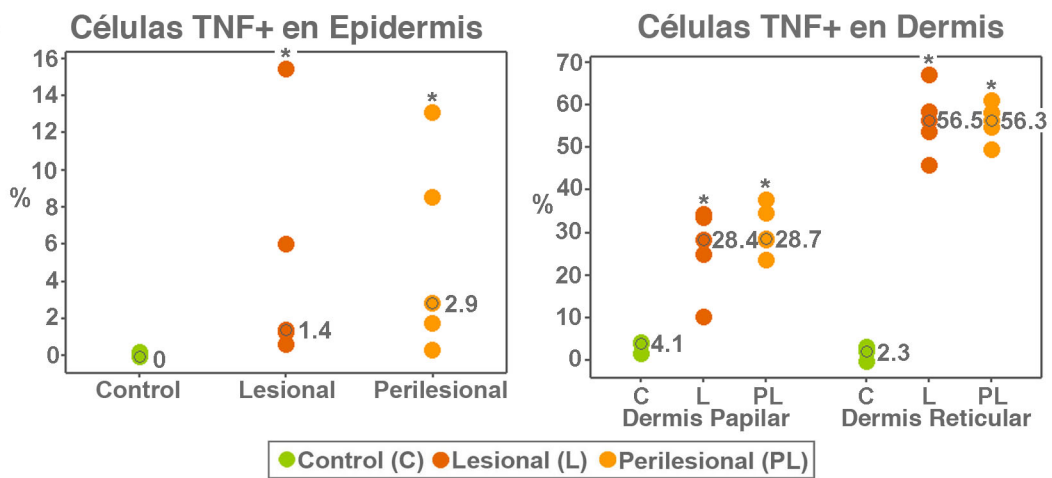
una marca tenue en células basales de epidermis cohesiva y el otro tenía unas cuantas células positivas alrededor de la cavidad de la ampolla. El resto de los pacientes mostró una tinción mínima. No detectamos TNF en epidermis control (Fig. 8B, izquierda). Al comparar los porcentajes de células positivas en epidermis lesional (1.4%) y perilesional (2.9%) con aquellos de la epidermis control (0%), se encontraron diferencias significativas (Fig. 8B, izquierda).

A diferencia de lo observado en epidermis, en la dermis de todos los pacientes se detectó abundante TNF. Además, la marca fue mayor en dermis que en epidermis. En la dermis, la intensidad de la marca fue mayor en dermis reticular que en papilar y, en ambos casos, la marca fue más evidente en dermis perilesional que lesional (Fig. 8A). En los controles solo se encontraron unas cuantas células positivas en dermis papilar y reticular. En dermis papilar lesional (28.4%) y perilesional (28.7%) se encontró un incremento significativo de células positivas para TNF en comparación con dermis papilar control (4.1%) (Fig. 8B, derecha). La diferencia fue también significativa en dermis reticular lesional (56.5%) y perilesional (56.3%) en comparación con dermis reticular control (2.3%) (Fig. 8B, derecha).

A



B



* Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$

Fig. 8: TNF está incrementado en dermis de pacientes con PV. A) En cortes de piel control (izquierda), con lesión (centro) y perilesional (derecha) se realizó IHQ para TNF. Las fotomicrografías muestran tinción para TNF tanto en dermis papilar como reticular de piel con lesión y perilesional de pacientes con PV. No se observó tinción en piel de controles sanos. Las flechas muestran células positivas representativas. B) El porcentaje de células positivas para TNF en epidermis lesional y perilesional es significativamente mayor que aquél de epidermis control (gráfica izquierda). El porcentaje de células TNF+ es significativamente mayor en dermis papilar lesional y perilesional (gráfica derecha, izquierda), así como en dermis reticular lesional y perilesional (gráfica derecha, derecha), en comparación con dermis control papilar y reticular. C- control, L- con lesión, PL- perilesional, O - mediana. Barra de microfotografía panorámica: 100 μ m, barra de los acercamientos: 30 μ m. * Diferencia significativa con el control, $p < 0.05$.

6.5 Monocitos fagocitan KC-A pero no KC-V ni KC-N

La presencia de TNF en la piel de los pacientes con PV no era prueba de que se estuviera produciendo en respuesta a un exceso de células apoptóticas. Por esa razón, se decidió determinar la producción de TNF por monocitos humanos derivados de sangre periférica tras el estímulo con cantidades ascendentes de KC-A. Elegimos monocitos derivados de sangre periférica porque se ha descrito que pueden extravasarse y llegar a sitios inflamatorios en procesos inflamatorios de la piel [99]. La pureza de monocitos siempre fue mayor a 85% (Fig. 9).

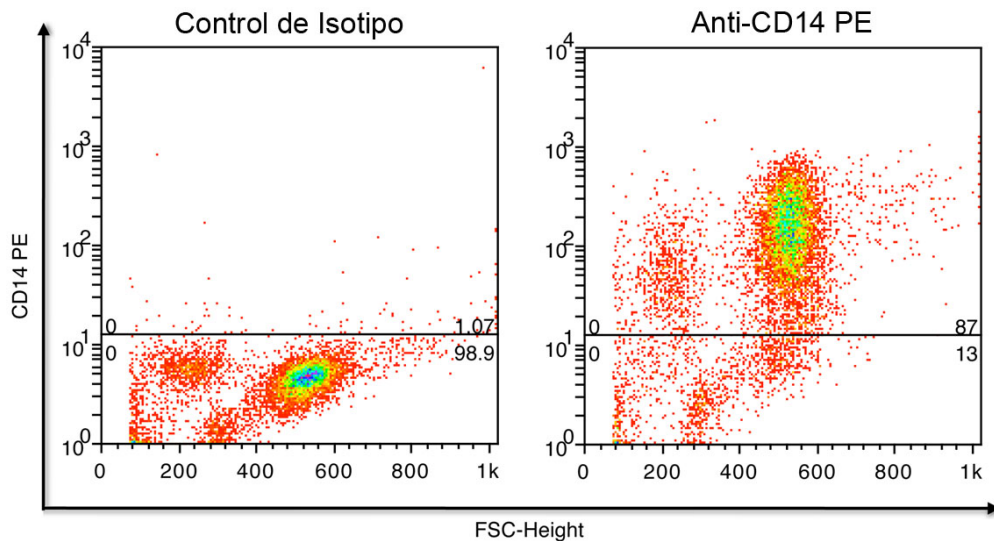


Fig. 9: Pureza de monocitos. Los monocitos se enriquecieron de PBMC por adherencia. Para determinar la pureza de la población, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD14 acoplado a PE o con el isotipo correspondiente y se analizaron por citometría. La pureza tras la adhesión fue aproximadamente de 87%.

Era importante determinar primero si los monocitos eran capaces de fagocitar KC-A porque se ha descrito que no son capaces de fagocitar neutrófilos senescentes [100]. Se cultivaron KC de la vaina radicular externa del pelo y se dividió el cultivo en tres grupos, dos se cultivaron en KC-SFM y uno en D-KC-SFM. El KC-SFM es un medio de cultivo para KC adicionado con extracto de hipófisis bovina y EGF, mientras que el D-KC-SFM está adicionado con factores de crecimiento recombinantes. Se utilizaron dos medios diferentes de cultivo porque con KC-SFM los KC permanecían vivos en cultivo más días que con D-KC-SFM, lo que era necesario para el control de células vivas, pero al tratar de inducirles apoptosis con camptotecina solo un porcentaje pequeño de las células moría por apoptosis (no se muestra). En cambio, con D-KC-SFM la mayor parte de las células moría por apoptosis al inducirle con camptotecina, como se verá más adelante. De los dos grupos cultivados en KC-SFM, el primero se mantuvo como control de células vivas y el segundo fue sometido a tres ciclos de congelación/descongelación para inducirle

necrosis. Al grupo cultivado con D-KC-SFM se le indujo apoptosis mediante tratamiento con camptotecina 5 μ M durante 72 h. Para asegurarse que los diferentes tipos de KC realmente estaban vivos, apoptóticos o necróticos, tras los tratamientos correspondientes se tiñeron con ioduro de propidio (IP) y Anexina V-FITC. Más del 93% del control de células vivas fueron negativas para IP y Anexina V-FITC, lo que indica que estaban vivas. En cambio, más de 82% de los KC tratados con camptotecina 5 μ M por 72 horas fueron positivos para anexina V-FITC-pero negativos para IP, características de células apoptóticas. Finalmente, más de 86% de los KC sometidos a 3 ciclos de congelación/descongelación fueron positivos para IP, lo que indica que estaban muertos con pérdida de la integridad de la membrana (Fig. 10B).

Para los experimentos de fagocitosis, se tiñeron los KC con CFSE 10 μ M antes de someterlos a cualquier tratamiento, y antes del co-cultivo con los monocitos. En placas de 24 pozos se cultivaron monocitos derivados de sangre periférica junto con KC-V, KC-A o KC-N en una relación 1:1 por 3 horas. Las células se tiñeron después con un anticuerpo contra CD14 acoplado a PE y se analizaron por citometría y por microscopía de fluorescencia (Fig. 10A). En el citómetro solo se analizó la región que incluía a la población de monocitos (R1). Cuando se co-cultivaron monocitos y KC-V, los primeros no fagocitaron a los segundos. Cuando los monocitos fueron cultivados junto con KC-N, solo un porcentaje pequeño de monocitos fagocitó KC. Sin embargo, cuando los monocitos se co-cultivaron con KC-A, los primeros sí fagocitaron KC o cuerpos apoptóticos (Fig. 10A izq.). Estos hallazgos fueron corroborados por microscopía de fluorescencia. Los monocitos co-cultivados con KC-V no contenían marcas de CFSE, aquellos cultivados con KC-N solo algunas veces presentaban marcas, mientras los monocitos cultivados junto con los KC-A frecuentemente se encontraban con marcas de CFSE (Fig. 10A derecha).

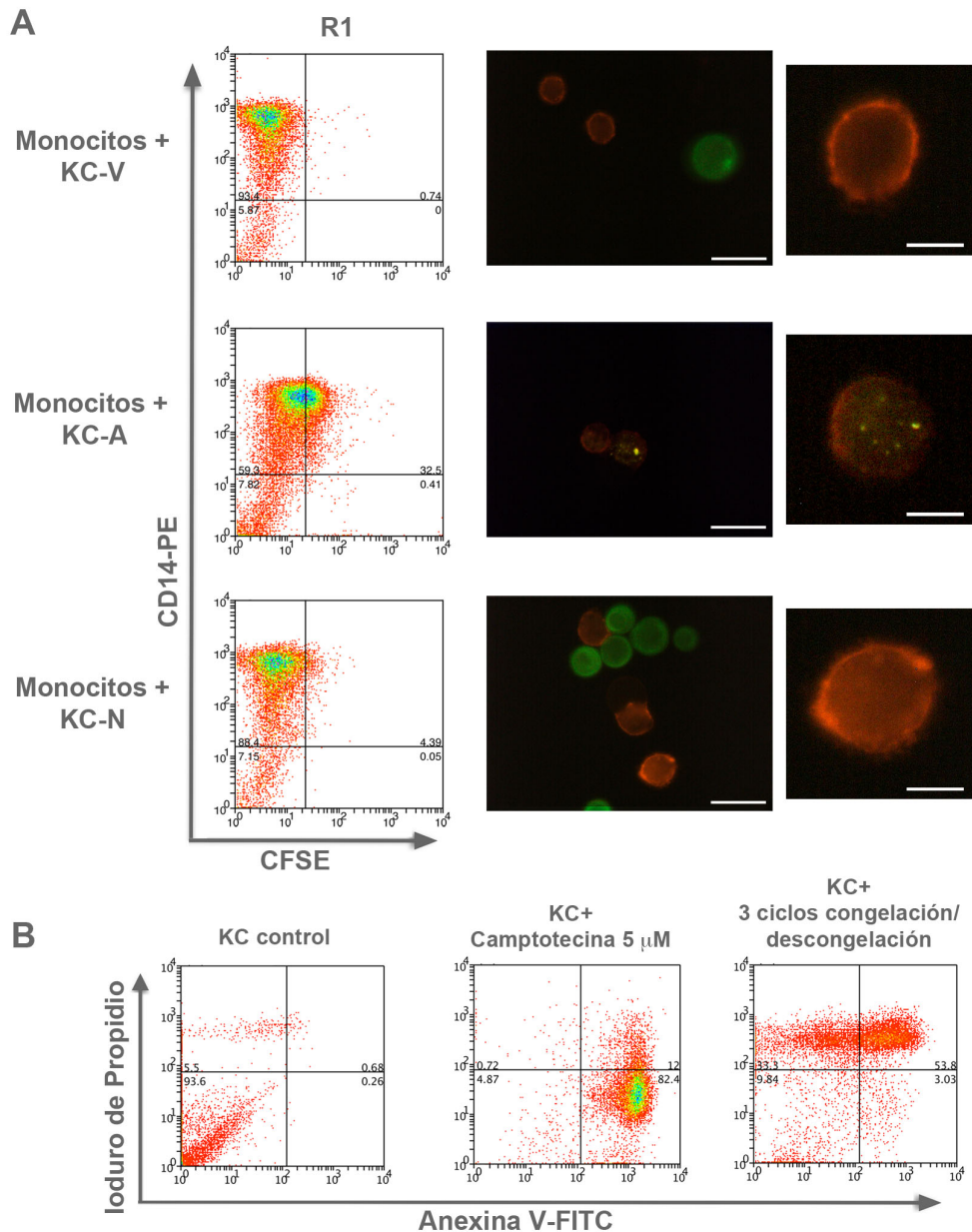


Fig. 10: Monocitos fagocitan a KC-A, pero no KC-V ni KC-N. (A) Monocitos fueron co-cultivados con KC - V (arriba), KC-A (centro) y KC-N (abajo) marcados con CFSE, y posteriormente fueron teñidos con una anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina (PE). La fagocitosis de KC-A se detectó mediante citometría de flujo (izquierda) y se confirmó por microscopía de fluorescencia (derecha). (B) KC en cultivo se dejaron sin tratamiento (control, izquierda), se incubaron durante 72 horas con camptotecina 5 μ M (centro) o se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación (derecha), antes de ser teñidos con anexina V-FITC y ioduro de propidio (IP). El 93% de los KC control continuaban vivos (anexina V-FITC -/ IP-), 82.4% de los KC tratados con camptotecina se encontraron apoptóticos (anexina V-FITC +/ IP-) y 87.1% de los KC sometidos

a congelación/descongelación estuvieron necróticos (PI+). Barra de microfotografía panorámica: 20 μm , barra de los acercamientos: 10 μm .

6.6 Una menor relación monocitos/KC-A ocasiona una mayor producción de TNF por parte de los monocitos

Habiendo comprobado que los monocitos de sangre periférica sí fagocitaban KC-A, el siguiente paso era evaluar la producción de TNF por monocitos en respuesta a KC -A. Los monocitos fueron incubados con cantidades ascendentes de KC-V, KC-A y KC-N. Como controles se agregaron también KC-V, KC-A y KC-N solos, así como monocitos solos, con esferas de poliestireno o estimulados con LPS. Los cultivos se incubaron 18 horas y la producción de TNF se cuantificó en los sobrenadantes mediante ELISA. Los KC-V, KC-A y KC-N produjeron niveles bajos de TNF (Fig. 11).

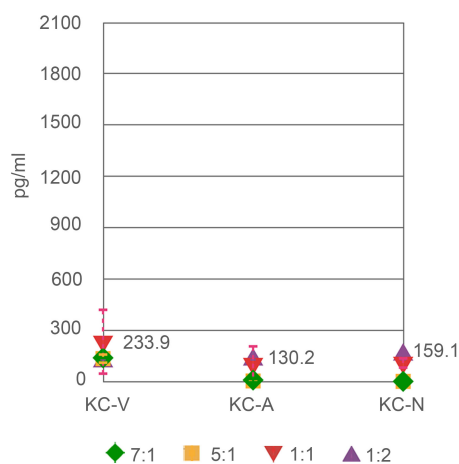


Fig. 11: KC-A producen una cantidad mínima de TNF. KC-V, KC-A y KC-N fueron cultivados solos por 18 horas, en la misma cantidad que cuando se cultivaban con monocitos en una relación de 7:1, 5:1, 1:1 y 1:2 (relación monocito:KC). Se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF mediante ELISA. Los KC-V produjeron una mayor cantidad de TNF que los KC-A o KC-N. En promedio, el mayor nivel detectado de TNF fue 233.9 pg/ml para KC-V, 130.2 pg/ml para KC-A y 159.1 pg/ml para KC-N. La producción de TNF por KC-A cultivados solos siempre fue menor que la producción de TNF en el co-cultivo de monocitos/KC-A.

Los monocitos solos no produjeron TNF, pero cuando se estimularon con LPS produjeron un promedio de 1835.1 pg/ml de TNF (Desviación estándar (DE): 356.1) (Fig. 12). Monocitos incubados con esferas de poliestireno tampoco produjeron TNF, igual que cuando fueron incubados con KC-V y KC-N en pocas cantidades. Sin embargo, cuando los monocitos fueron cultivados con KC-V o KC-N en una relación 1:1 ó 1:2, la producción de TNF varió entre 140.6 pg/ml y 196.8 pg/ml (Fig. 12). Estas cantidades de TNF fueron pequeñas en comparación con aquéllas producidas por monocitos cocultivados con KC-A. La producción de TNF depende de la relación monocitos:KC, ya que una relación pequeña lleva a una mayor producción de TNF. La producción más baja de TNF, que fue 155.1 pg/ml (DE: 55.1), se detectó con una relación de 7:1 (monocitos :KC), seguida por 274.8 pg/ml (DE: 114.8) con una relación 5:1, 569.5 pg/ml con una relación 1:1 y finalmente 1096.5 pg/ml (DE: 303) con una proporción 1:2 (Fig. 12). Por lo tanto, monocitos co-cultivados con KC-A producen una mayor cantidad de TNF que aquéllos co-cultivados con KC-V o KC-N. Más aún, este incremento correlaciona directamente con el número de KC-A co-cultivados con monocitos.

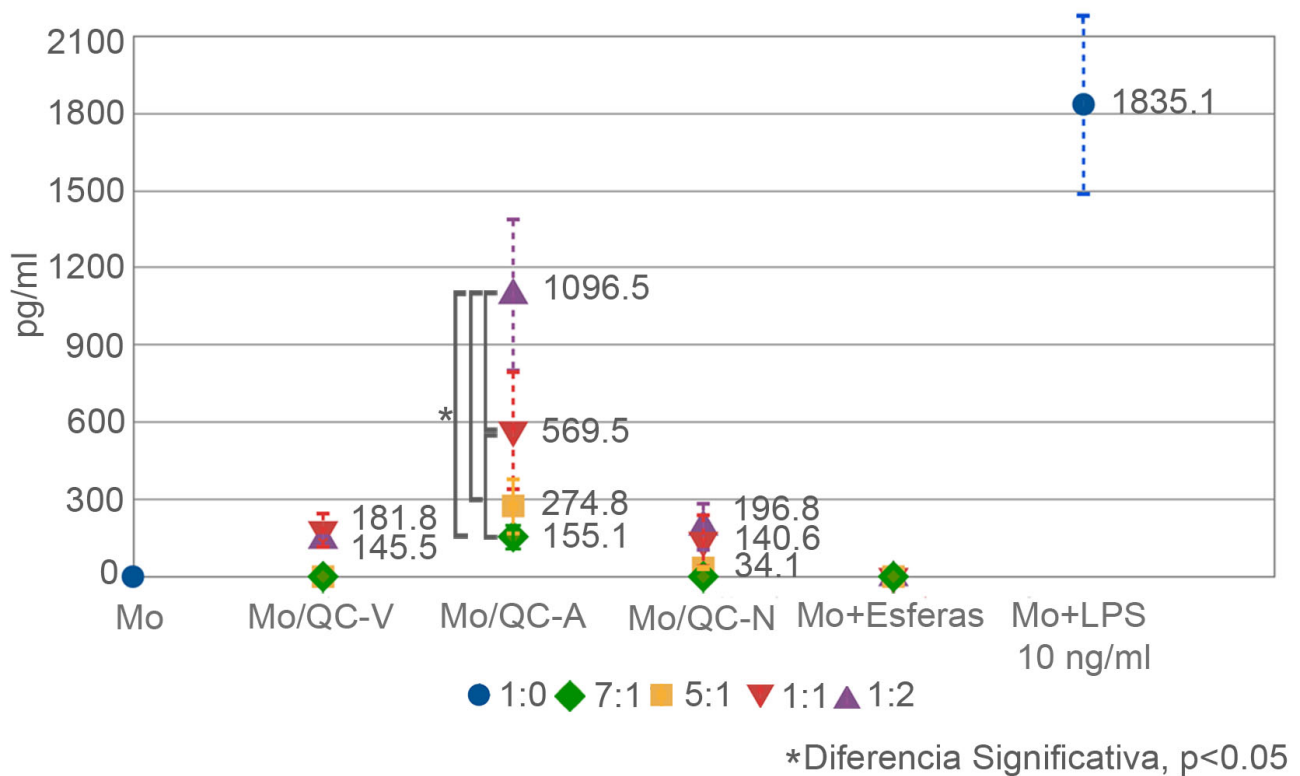


Fig. 12: Una mayor proporción de KC-A lleva a una mayor producción de TNF por parte de monocitos. Monocitos (Mo) se cultivaron solos (1:0), se estimularon con LPS 10 ng/ml (Mo+LPS 10 ng/ml), se co-cultivaron con KC-V (Mo/KC-V), KC-A (Mo/KC-A), KC-N (Mo/KC-N) o con esferas de poliestireno (Mo+Esferas) en una relación monocito:KC de 7:1, 5:1, 1:1 o 1:2, durante 18 horas. Posteriormente se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF mediante ELISA. Una mayor proporción de KC-A en el co-cultivo lleva a una mayor producción de TNF por los monocitos. Los KC-A inducen una mayor producción de TNF por parte de los monocitos que KC-V o KC-N. * Diferencia significativa, $p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN

Durante muchos años, la apoptosis ha sido causa de debate en PV. La discusión ha girado siempre en torno a la participación de la apoptosis como causa directa de la acantólisis, sin embargo, nunca se había considerado que pudiera estar participando de forma indirecta en la formación de las lesiones. En este trabajo nosotros demostramos que la apoptosis no tiene que ser causa directa de la acantólisis para ser perjudicial en PV. La acumulación de células apoptóticas puede contribuir al daño epidérmico a través

de la producción de TNF que, a su vez, puede causar más muerte celular, cerrando un círculo vicioso. Estamos conscientes del pequeño número de pacientes en este estudio; sin embargo, hay que considerar que se trata de pacientes nuevos, sin tratamiento previo, de una enfermedad con una incidencia muy baja.

Tras muchos años de investigación tratando de establecer si la apoptosis es causa de, o más bien, es consecuencia de la acantólisis [60, 61, 63-65, 67, 101], recientemente se publicó que la apoptosis no es necesaria para que ocurra acantólisis en PV [67]. Aun siendo así, en PV ocurre apoptosis y está presente en la epidermis de los pacientes, como se ha demostrado previamente [60, 61, 63] y como nosotros demostramos en este trabajo. En cinco pacientes con PV que no habían recibido tratamiento previo encontramos, mediante TUNEL e IHQ contra caspasa 3 activada, que más del 40% de las células están muertas, tanto en epidermis lesional como perilesional (Fig. 3C). Aparentemente, la apoptosis en la epidermis aparece conforme las lesiones progresan, ya que no fue detectada en lesiones muy tempranas [67] pero es evidente en lesiones bien establecidas (Fig. 3). Nosotros también observamos muerte celular en epidermis perilesional sin acantólisis, como otros han reportado [60, 61, 63], pero esto no puede ser tomado como argumento para señalar a la apoptosis como causa de acantólisis, ya que también se encontraron células apoptóticas por encima de la capa suprabasal de la epidermis, donde no ocurre acantólisis en PV.

Sorprendentemente, la apoptosis no solo afecta la epidermis de los pacientes, también está presente en la dermis papilar y reticular de todos ellos, algo que no había sido reportado antes. Los porcentajes de muerte celular fueron ligeramente más bajos que aquellos de epidermis, pero aún así, por lo menos 30% de las células fueron positivas para TUNEL y caspasa 3 activada (Fig. 4B, C). Como en la epidermis, las células

apoptóticas dérmicas están presentes en casi la misma proporción que las células vivas, lo que las hace un componente principal de las lesiones de PV. Las células apoptóticas rara vez se detectan en tejidos humanos sanos, gracias a una remoción rápida y eficiente [76]. La presencia detectable de células apoptóticas en la epidermis de pacientes con PV podría ser el resultado de una carga excesiva de células en ese estado, un proceso de remoción ineficiente o una combinación de los dos. Nosotros creemos que este último fenómeno está contribuyendo al exceso de células apoptóticas en PV. Los autoanticuerpos y otros factores humorales causan un incremento en la cantidad de KC-A en PV [60, 61, 65]. La eliminación de células apoptóticas en la epidermis sana ocurre por descamación y, probablemente por fagocitosis por KC vecinos; la remoción por células del sistema fagocítico mononuclear ocurre infrecuentemente [100]. En PV, el proceso de eliminación ineficiente puede deberse a dos factores: el primero, que solo algunas células apoptóticas se pierden por descamación cuando la ampolla se forma y se rompe. El segundo, que los KC-A que quedan en la epidermis cohesiva, que deberían de ser removidos por células vecinas, no son fagocitados porque la mayoría de los KC vecinos también están muertos. Eso deja a las células del sistema fagocítico mononuclear a cargo de la remoción de los KC-A acumulados. Sin embargo, no están teniendo éxito, lo que es más, ni siquiera están logrando alcanzar la epidermis en grandes números. En la epidermis perilesional, las células CD1a+ estuvieron significativamente incrementadas en comparación con la epidermis control: 6.4 vs. 3.1%. En la epidermis lesional, sin embargo, tendieron a estar disminuidas en comparación con la epidermis control: 2.6 vs. 3.1% (Fig. 5B). Una posibilidad es que en lesiones tempranas (epidermis perilesional) las células CD1a+ epidérmicas sí incrementan, fagocitan células apoptóticas y luego migran para presentar antígenos a linfocitos T y por eso, se encuentran en una proporción menor en lesiones más avanzadas (epidermis lesional). Otro dato que sugiere que eso pueda estar pasando es la tendencia a que una mayor proporción de células CD1a+ está presente en

la dermis lesional que en la perilesional (Fig. 5B). Aunque la proporción de monocitos/macrófagos CD14+ tendió a incrementar en la epidermis perilesional (0.4%) y lesional (1.2%) de los pacientes con PV en comparación con la epidermis control (0.1%), la diferencia no fue estadísticamente significativa. No obstante, la proporción de células CD14+ estuvo incrementada en la dermis lesional (10.6% en la papilar y 16.1% en la reticular) y aún más en la dermis perilesional (17.9% en la papilar y 22% en la reticular) en comparación con la dermis control (6.6% en la papilar y 6.9% en la reticular) (Fig. 6B). Esos datos llevan a preguntar qué puede estar impidiendo que las células CD14+ lleguen hasta la epidermis. Una posibilidad es que sean retenidas en la dermis por las células apoptóticas ahí presentes, o bien, que mueran antes de poder llegar a la epidermis.

La siguiente duda que había que resolver entonces era qué células estaban muriendo en la dermis. A diferencia de la epidermis, la apoptosis en la dermis no puede ser explicada por los autoanticuerpos de PV ni por la acantólisis. Cuando ocurre inflamación, la apoptosis juega un papel muy importante en el control de la respuesta inflamatoria. De hecho, ya se ha descrito que 26-35% de las células de un infiltrado inflamatorio dérmico de heridas de 7 días están apoptóticas [102]. Aunque encontramos mencionado en la literatura en repetidas ocasiones que en las lesiones de pénfigo se encuentra escaso infiltrado inflamatorio [103-105], un estudio inmunohistológico previo reportó un infiltrado inflamatorio en piel lesional de pacientes con pénfigo [106] y nosotros corroboramos un infiltrado en PV compuesto por células CD1a+, CD14+, CD8+ (no se muestra) y CD56+ (no se muestra). Eso nos hizo pensar que las células apoptóticas acumuladas en la dermis pudieran ser leucocitos. Efectivamente, mediante una doble tinción con TUNEL y un marcador de superficie, se corroboró que células pertenecientes a tres linajes de células inflamatorias, linfocitos CD4+, células dendríticas CD1a+ y monocitos/macrófagos CD14+, forman parte de las células apoptóticas dérmicas acumuladas (Fig. 7). Es

importante mencionar que no todas las células con esos marcadores estaban muertas. Eso hace posible que, efectivamente, los monocitos/macrófagos CD14+ no estén llegando a la epidermis en mayor cantidad porque mueren o son retenidos en la dermis por las otras células apoptóticas dérmicas.

Generalmente se acepta que las células apoptóticas son antiinflamatorias y, cuando son removidas por monocitos o macrófagos, suprimen la respuesta inmune innata y promueven la resolución de la inflamación [79, 107]. Sin embargo, hay evidencia *in vivo* de que la eliminación de células apoptóticas puede activar a macrófagos [108] y, si las células apoptóticas no son removidas a tiempo, pueden evolucionar a células necróticas secundarias, promover inflamación e incluso volverse inmunogénicas [107]. Se ha demostrado que las células necróticas secundarias (postapoptóticas) liberan moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés, *Damage Associated Molecular Patterns*) que pueden ser reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés, *Pattern Recognition Receptors*) como TLRs (por sus siglas en inglés, *Toll-Like Receptors*) o RAGE (por sus siglas en inglés, *Receptor for Advanced Glycosylation End products*) y promover una respuesta inflamatoria [109]. Las células necróticas secundarias liberan específicamente ácido úrico, HMGB-1 (por sus siglas en inglés *High Mobility Group Binding Protein-1*), una molécula que se asocia con nucleosomas derivados de células necróticas secundarias, y autoantígenos modificados [98]. El complejo HMGB-1-nucleosoma puede ser reconocido por RAGE y TLR-2, mientras que el ácido úrico puede activar directamente al inflamasoma NALP 3, induciendo la producción de IL-1 β [109]. De esta forma, directa o indirectamente, ambos pueden promover la producción de TNF por células del sistema fagocítico mononuclear como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Nos preguntamos si la acumulación de células apoptóticas podría ser

inflamatoria en este caso. Se decidió buscar la presencia de TNF en la piel de los pacientes con PV. Similar a lo que ya se había descrito [92], encontramos tinción positiva para TNF en la epidermis de 2 de los 5 pacientes con PV estudiados. El TNF estuvo presente predominantemente en células acantolíticas y células alrededor de la cavidad de la ampolla, aunque en un paciente sí encontramos tinción en todas las capas de la epidermis en un área. La distribución de TNF en células acantolíticas y alrededor de la ampolla coincide con un estudio previo en el que se buscó la presencia de TNF en la epidermis de pacientes con pénfigo por FISH e inmunofluorescencia indirecta [92]. Nosotros, además, encontramos que hay una producción muy importante de TNF en la dermis de pacientes con PV, algo no descrito previamente. La intensidad de la marca es mayor en la dermis perilesional que en la lesional y es mayor en dermis reticular que en dermis papilar (Fig. 8). El TNF podría ser uno de los factores involucrados en la muerte celular dérmica, ya que la apoptosis de leucocitos puede ser inducida por la unión del TNF con su receptor [110]. La intensidad incrementada de la tinción en la piel perilesional refleja una mayor cantidad de TNF, que puede estar causando la muerte de muchas células. Una vez que las células mueren, dejan de producir TNF. Posiblemente, el hecho de que las células en la piel lesional llevan más tiempo muertas que las células en la piel perilesional sea la causa de una menor intensidad de la marca del TNF en la piel lesional. Sería interesante saber si hay TNF presente en dermis no afectada de pacientes con PV. El incremento progresivo de la intensidad de la tinción desde la epidermis hasta la dermis reticular podría ser explicado de la misma manera: la lesión de PV comienza en la epidermis, luego se involucra la dermis papilar y, finalmente, la reticular, lo que causa que la producción y la presencia de TNF empiece a disminuir desde la capa más superior hasta la más profunda.

La producción de TNF en la dermis puede ser inducida por muchos estímulos diferentes, por ejemplo, pérdida de la barrera epitelial, infecciones potenciales y activación de linfocitos. Otro estímulo podría ser el exceso de células apoptóticas mismo. En nuestros experimentos, monocitos derivados de sangre periférica estimulados con KC-A produjeron TNF. Lo que es más, un mayor número de KC-A causó una mayor producción de TNF (Fig. 12). No se vio el mismo efecto con cantidades ascendentes de KC-V o KC-N, lo que apoya la idea de que uno o varios factores derivados de las células apoptóticas están generando esa respuesta. Los monocitos también fueron incubados con esferas de poliestireno y, aunque también las fagocitaron (no se muestra), no produjeron TNF. Esto excluye que la simple fagocitosis lleve a la producción de TNF. Era de esperarse que se produjera TNF tras la incubación de los monocitos con células necróticas, pero no fue así (Fig. 12). Es posible que durante la generación de células necróticas ocurriera degradación o inactivación de las moléculas intracelulares proinflamatorias. Dado que los monocitos producen TNF tras la remoción de KC-A es posible que ocurra un círculo vicioso en PV. Los KC producen primero TNF en respuesta a los autoanticuerpos de PV, ambos estímulos inducen apoptosis de los KC, éstos se acumulan y entonces promueven una mayor producción de TNF por parte de monocitos que a su vez genera más muerte celular. Tal vez no solo el TNF esté implicado en esa muerte celular excesiva, la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos provoca la liberación de FasL resultando en apoptosis de células vecinas [111]. Aunado a esto, FasL, otro inductor de apoptosis, está también incrementado en pacientes con PV.

Finalmente, vale la pena mencionar que en otras enfermedades autoinmunes, se ha demostrado que las células apoptóticas sirven como reservorios de autoantígenos que mantienen la autoinmunidad en personas susceptibles. Se ha observado que la acumulación de células apoptóticas perturba la tolerancia inducida por células apoptóticas

[112]. Las células dendríticas pueden presentar antígenos propios a linfocitos T CD4+ y CD8+ e inducir una respuesta inmune efectiva contra esos antígenos [113, 114]. Los pacientes con PV desarrollan anticuerpos contra muchas moléculas diferentes de los KC incluyendo desmocolinas, placoglobina, E-cadherina, FcεR1α, anexina 31, receptores de acetilcolina [89] y, más recientemente descritos, hasta anticuerpos antimitocondriales [26]. Sería interesante saber si la fagocitosis de células apoptóticas por células dendríticas también está contribuyendo a expandir el repertorio de autoantígenos en PV. La apoptosis es un componente importante de las lesiones de PV y podría estar contribuyendo a la acantólisis de diversas maneras.

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que un gran número de células apoptóticas están presentes en la epidermis y dermis de la piel lesional y perilesional de pacientes con PV. Además, en la piel de estos pacientes también hay niveles elevados de TNF, no solo en la epidermis, como se había descrito antes, sino también en las capas dérmicas. Así mismo, pudimos demostrar que la eferocitosis de KC-A por monocitos lleva a una mayor producción de TNF. Tomando todo esto en cuenta, nosotros proponemos que un mecanismo adicional que favorece la persistencia de lesiones en PV es una producción elevada de TNF por parte de monocitos que interactúan con una gran cantidad de células apoptóticas acumuladas en dermis y epidermis de lesiones de pacientes con PV. La elevada producción de TNF, a su vez, genera mayor número de células apoptóticas, con lo cual se establece un círculo vicioso que favorece la persistencia del PV.

9. REFERENCIAS

1. Fitzpatrick, T.B., et al., Color atlas and synopsis of clinical dermatology. 4th ed. 2001, New York: Mc Graw Hill. p. 94.

2. Langan, S.M., et al., Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ*, 2008. 337: p. a180.
3. Bertram, F., et al., Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2009. 7(5): p. 434-40.
4. Ahmed, A.R., et al., Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(19): p. 7658-62.
5. Carcassi, C., et al., HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens*, 1996. 48(6): p. 662-7.
6. Miyagawa, S., et al., HLA-DRB1*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese. *J Invest Dermatol*, 1997. 109(5): p. 615-8.
7. Gonzalez-Escribano, M.F., et al., Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens*, 1998. 52(3): p. 275-8.
8. Delgado, J.C., et al., Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. *Hum Immunol*, 1997. 57(2): p. 110-9.
9. Lee, E., et al., Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris. *Hum Immunol*, 2006. 67(1-2): p. 125-39.
10. Ahmed, A.R., et al., Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(11): p. 5056-60.
11. Vega-Memije, M.E., et al., [Analysis of HLA-DR in Mexican patients with pemphigus]. *Gac Med Mex*, 2001. 137(6): p. 535-40.

12. Veldman, C.M., et al., T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol*, 2004. 172(6): p. 3883-92.
13. Ruocco, E., A. Aurilia, and V. Ruocco, Precautions and suggestions for pemphigus patients. *Dermatology*, 2001. 203(3): p. 201-7.
14. Brenner, S., et al., Pemphigus vulgaris: environmental factors. Occupational, behavioral, medical, and qualitative food frequency questionnaire. *Int J Dermatol*, 2001. 40(9): p. 562-9.
15. Wang, G.Q., et al., Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J Am Acad Dermatol*, 2005. 52(3 Pt 1): p. 460-7.
16. Beutner, E.H. and R.E. Jordon, Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1964. 117: p. 505-10.
17. Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley, Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*, 1991. 67(5): p. 869-77.
18. Ding, X., et al., Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol*, 1997. 109(4): p. 592-6.
19. Waschke, J., The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, 2008. 130(1): p. 21-54.
20. Muller, E.J., et al., Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol*, 2008. 128(3): p. 501-16.
21. Cozzani, E., et al., Antidesmoplakin antibodies in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*, 2006. 154(4): p. 624-8.

22. Korman, N.J., et al., Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med*, 1989. 321(10): p. 631-5.
23. Evangelista, F., et al., E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(7): p. 1710-8.
24. Nguyen, V.T., A. Ndoye, and S.A. Grando, Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem*, 2000. 275(38): p. 29466-76.
25. Nguyen, V.T., A. Ndoye, and S.A. Grando, Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol*, 2000. 157(4): p. 1377-91.
26. Marchenko, S., et al., Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology. *J Biol Chem*, 2010. 285(6): p. 3695-704.
27. Merlob, P., et al., Neonatal pemphigus vulgaris. *Pediatrics*, 1986. 78(6): p. 1102-5.
28. Anhalt, G.J., et al., Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med*, 1982. 306(20): p. 1189-96.
29. Schiltz, J.R. and B. Michel, Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol*, 1976. 67(2): p. 254-60.
30. Payne, A.S., et al., Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(5): p. 536-43.
31. van Joost, T., R.H. Cormane, and K.W. Pondman, Direct immunofluorescent study of the skin on occurrence of complement in pemphigus. *Br J Dermatol*, 1972. 87(5): p. 466-74.

32. Hashimoto, K., et al., Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med*, 1983. 157(1): p. 259-72.
33. Anhalt, G.J., et al., Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. *J Immunol*, 1986. 137(9): p. 2835-40.
34. Schuh, T., et al., Protease inhibitors prevent plasminogen-mediated, but not pemphigus vulgaris-induced, acantholysis in human epidermis. *Biol Chem*, 2003. 384(2): p. 311-5.
35. Mahoney, M.G., Z.H. Wang, and J.R. Stanley, Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. *J Invest Dermatol*, 1999. 113(1): p. 22-5.
36. Futei, Y., et al., Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 2000. 115(5): p. 829-34.
37. Sekiguchi, M., et al., Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol*, 2001. 167(9): p. 5439-48.
38. Tsunoda, K., et al., Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol*, 2003. 170(4): p. 2170-8.
39. Heupel, W.M., et al., Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol*, 2008. 181(3): p. 1825-34.
40. Heupel, W.M., et al., Peptides Targeting the Desmoglein 3 Adhesive Interface Prevent Autoantibody-induced Acantholysis in Pemphigus. *J Biol Chem*, 2009. 284(13): p. 8589-95.

41. Hashimoto, K. and W.F. Lever, An electron microscopic study on pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement. *J Invest Dermatol*, 1967. 48(6): p. 540-52.
42. Hashimoto, K. and W.F. Lever, The intercellular cement in pemphigus vulgaris, an electron microscopic study. *Dermatologica*, 1967. 135(1): p. 27-34.
43. Bystryn, J.C. and S.A. Grando, A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis. *J Am Acad Dermatol*, 2006. 54(3): p. 513-6.
44. Pretel, M., et al., An imbalance in Akt/mTOR is involved in the apoptotic and acantholytic processes in a mouse model of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol*, 2009. 18(9): p. 771-80.
45. Grando, S.A., et al., Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. *Exp Dermatol*, 2009. 18(9): p. 764-70.
46. Calautti, E., et al., Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *J Biol Chem*, 2005. 280(38): p. 32856-65.
47. Thrash, B.R., et al., AKT1 provides an essential survival signal required for differentiation and stratification of primary human keratinocytes. *J Biol Chem*, 2006. 281(17): p. 12155-62.
48. Williamson, L., et al., Nuclear c-Myc: a molecular marker for early stage pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(6): p. 1549-55.
49. Williamson, L., et al., Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *EMBO J*, 2006. 25(14): p. 3298-309.
50. Chernyavsky, A.I., et al., Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. *J Biol Chem*, 2007. 282(18): p. 13804-12.

51. Frusic-Zlotkin, M., et al., Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity*, 2006. 39(7): p. 563-75.
52. Cirillo, N., et al., If pemphigus vulgaris IgG are the cause of acantholysis, new IgG-independent mechanisms are the concause. *J Cell Physiol*, 2007. 212(3): p. 563-7.
53. Feliciani, C., et al., In vitro and in vivo expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha are involved in acantholysis. *J Invest Dermatol*, 2000. 114(1): p. 71-7.
54. Orlov, M.D., et al., Synergistic actions of pemphigus vulgaris IgG, Fas-ligand and tumor necrosis factor-alpha during induction of basal cell shrinkage and acantholysis. *Autoimmunity*, 2006. 39(7): p. 557-62.
55. Grando, S.A., et al., Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*, 1989. 125(7): p. 925-30.
56. Narbutt, J., et al., Serum concentration of interleukin-6 is increased both in active and remission stages of pemphigus vulgaris. *Mediators Inflamm*, 2008. 2008: p. 875394.
57. Bhol, K.C., et al., Pemphigus vulgaris: the role of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in pathogenesis and effects of intravenous immunoglobulin on their production. *Clin Immunol*, 2001. 100(2): p. 172-80.
58. Bhol, K.C., et al., Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. *Cytokine*, 2000. 12(7): p. 1076-83.
59. D'Auria, L., et al., Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as

- compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw*, 1997. 8(4): p. 383-7.
60. Wang, X., et al., Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. *Apoptosis*, 2004. 9(2): p. 131-43.
 61. Puviani, M., et al., Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. *J Invest Dermatol*, 2003. 120(1): p. 164-7.
 62. Kim, N.H., et al., Impaired PI3K/Akt activation-mediated NF-kappaB inactivation under elevated TNF-alpha is more vulnerable to apoptosis in vitiliginous keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(11): p. 2612-7.
 63. Gniadecki, R., et al., Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases. *Arch Dermatol Res*, 1998. 290(10): p. 528-32.
 64. Baroni, A., et al., Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. *Br J Dermatol*, 2004. 150(6): p. 1070-80.
 65. Pelacho, B., et al., Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett*, 2004. 566(1-3): p. 6-10.
 66. Wang, X., et al., Replicative senescence enhances apoptosis induced by pemphigus autoimmune antibodies in human keratinocytes. *FEBS Lett*, 2004. 567(2-3): p. 281-6.
 67. Schmidt, E., et al., Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. 296(1): p. C162-72.
 68. Galluzzi, L., et al., Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 2007. 14(7): p. 1237-43.
 69. Kumar, S., Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 2007. 14(1): p. 32-43.

70. Jin, Z. and W.S. El-Deiry, Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 2005. 4(2): p. 139-63.
71. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(3): p. 231-41.
72. Lauber, K., et al., Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 2003. 113(6): p. 717-30.
73. Grimsley, C. and K.S. Ravichandran, Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(12): p. 648-56.
74. Scott, R.S., et al., Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 2001. 411(6834): p. 207-11.
75. Hume, D.A., V.H. Perry, and S. Gordon, Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol*, 1983. 97(1): p. 253-7.
76. Leers, M.P., et al., An immunohistochemical study of the clearance of apoptotic cellular fragments. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(8): p. 1358-65.
77. Walsh, G.M., et al., Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. *Blood*, 1999. 94(8): p. 2827-35.
78. Erwig, L.P. and P.M. Henson, Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 2008. 15(2): p. 243-50.
79. Voll, R.E., et al., Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 1997. 390(6658): p. 350-1.
80. Byrne, A. and D.J. Reen, Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol*, 2002. 168(4): p. 1968-77.

81. Monks, J., et al., Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ*, 2005. 12(2): p. 107-14.
82. Cvetanovic, M., et al., Specific recognition of apoptotic cells reveals a ubiquitous and unconventional innate immunity. *J Biol Chem*, 2006. 281(29): p. 20055-67.
83. Peter, C., et al., Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis*, 2010. 20: p. R940-2.
84. Shi, Y. and K.L. Rock, Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens. *Eur J Immunol*, 2002. 32(1): p. 155-62.
85. Bell, D.A. and B. Morrison, The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to, nucleosomes in vitro. *Clin Immunol Immunopathol*, 1991. 60(1): p. 13-26.
86. Bell, C.W., et al., The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. 291(6): p. C1318-25.
87. Urbonaviciute, V., et al., Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*, 2008. 205(13): p. 3007-18.
88. Decker, P., et al., Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol*, 2005. 174(6): p. 3326-34.
89. Kurzen, H. and S. Brenner, Significance of autoimmunity to non-desmoglein targets in pemphigus. *Autoimmunity*, 2006. 39(7): p. 549-56.
90. Shetty, A., et al., Successful treatment of pemphigus vulgaris with etanercept in four patients. *J Drugs Dermatol*, 2009. 8(10): p. 940-3.

91. Jacobi, A., G. Shuler, and M. Hertl, Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab. *Br J Dermatol*, 2005. 153(2): p. 448-9.
92. Lopez-Robles, E., et al., TNFalpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. *Int J Dermatol*, 2001. 40(3): p. 185-8.
93. Frusic-Zlotkin, M., et al., The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells: activation of the fas apoptotic pathway and the use of caspase activity for pathogenicity tests of pemphigus patients. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1050: p. 371-9.
94. Savill, J., et al., A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(12): p. 965-75.
95. Savill, J. and V. Fadok, Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 784-8.
96. Cline, A.M. and M.Z. Radic, Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity. *Clin Immunol*, 2004. 112(2): p. 175-82.
97. Limat, A. and T. Hunziker, Cultivation of keratinocytes from the outer root sheath of human hair follicles. *Methods Mol Med*, 1996. 2: p. 21-31.
98. Peter, C., et al., Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis*.
99. van Furth, R., et al., The characterization, origin, and kinetics of skin macrophages during inflammation. *J Invest Dermatol*, 1985. 85(5): p. 398-402.
100. Newman, S.L., J.E. Henson, and P.M. Henson, Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*, 1982. 156(2): p. 430-42.
101. Arredondo, J., et al., Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. *Am J Pathol*, 2005. 167(6): p. 1531-44.

102. Edwards, M. and D. Jones, Programmed cell death in human acute cutaneous wounds. *J Cutan Pathol*, 2001. 28(3): p. 151-5.
103. Bystry, J.C. and J.L. Rudolph, Pemphigus. *Lancet*, 2005. 366(9479): p. 61-73.
104. Ioannides, D., E. Lazaridou, and D. Rigopoulos, Pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2008. 22(12): p. 1478-96.
105. Di Bisceglie, M.B., A. Lucchese, and V. Crincoli, Pemphigus: the promises of peptide immunotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2009. 31(4): p. 509-15.
106. Zillikens, D., et al., Evidence for cell-mediated immune mechanisms in the pathology of pemphigus. *Br J Dermatol*, 1993. 128(6): p. 636-43.
107. Lauber, K., et al., Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*, 2004. 14(3): p. 277-87.
108. Lorimore, S.A., et al., Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene*, 2001. 20(48): p. 7085-95.
109. Green, D.R., et al., Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(5): p. 353-63.
110. Watson, R.W., et al., Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils. *Shock*, 1996. 5(1): p. 47-51.
111. Brown, S.B. and J. Savill, Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol*, 1999. 162(1): p. 480-5.
112. Rosen, A. and L. Casciola-Rosen, Clearing the way to mechanisms of autoimmunity. *Nat Med*, 2001. 7(6): p. 664-5.
113. Rawson, P.M., et al., Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat Med*, 2007. 13(12): p. 1431-9.
114. Rovere, P., et al., Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol*, 1998. 161(9): p. 4467-71.

10. APÉNDICE

10.1 Reactivos

Ácido clorhídrico, HCl (J.T. Baker, 9535-02)

Adenina (Sigma-Aldrich, No. Cat. A-2786)

Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, A7888)

Anfotericina B (Fungizone) (GIBCO, No. Cat. 15290018)

Bicarbonato de sodio, NaHCO₃ (J.T.Baker, 3506-01)

Caseína (Sigma-Aldrich, C7078)

Citrato de sodio (Sigma-Aldrich, W302600)

Cloruro de calcio, Ca₂Cl (Sigma-Aldrich, 3306)

Cloruro de magnesio, MgCl₂ (Sigma-Aldrich, M0250)

Cloruro de potasio, KCl (Sigma-Aldrich, P9333)

Cloruro de sodio, NaCl (J.T. Baker, 3624-05)

Dietanolamina 98.5% (Sigma-Aldrich, 398179)

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) en polvo (GIBCO, 31600-026)

EDTA (J.T. Baker, 8991-01)

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma-Aldrich, No. Cat. E-4127)

Fosfato dibásico de sodio, Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, S7907)

Fosfato monobásico de potasio, KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, P0662)

Glutamina (GIBCO, No. Cat. 25030-081)

Ham's F12 (Cambrex, No. Cat. 12-6156-F)

HEPES (J.T. Baker, 4018)

Hidrocortisona (Sigma-Aldrich, No. Cat. H-4001)

Hidróxido de sodio, NaOH (Sigma-Aldrich, S8045)

Insulina (Novolin R, Novo Nordisk)

Paraformaldehído (Sigma-Aldrich, 158127)

Penicilina 5000 U/ estreptomina 5000 µg (GIBCO, 15070-063)

RPMI 1640 en polvo (GIBCO, 31800-014)

Suero Fetal Bovino (GIBCO, 26140-079)

Toxina del cólera (Sigma-Aldrich, No. Cat. C-8052)

Triiodotironina (T3) (Sigma-Aldrich, No. Cat. T-2877)

Tripsina 10x (GIBCO, No. Cat. 15090046)

Tritón X-100

Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)

Tween 80 (Sigma-Aldrich, P1754)

10.2 Preparación de soluciones

10.2.1 Buffer de unión

- Para ELISA
- Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0.1 M, pH 9.0.
 - Peso molecular del Na_2HPO_4 : 142.
- Para preparar una solución 0.1 M, disolver en 1 L de agua MilliQ:
 - Na_2HPO_4 - 14.2 g
- Ajustar el pH con ácido clorhídrico diluido (con una concentración 5 M se usan aproximadamente 200 µl).
- Filtrar y guardar a 4°C.

10.2.2 Buffer de sustrato

- Para ELISA
- Pesar en un vaso de precipitados de plástico:
 - Dietanolamina 98.5%- 70g
- Agregar:
 - Agua MilliQ- 490 ml

- Solución 0.1M de cloruro de magnesio (MgCl_2)- 3500 μl
- Agitar, ajustar el pH a 9.8 con ácido clorhídrico diluído.
- Filtrar y guardar a 4°C, protegido de la luz.
- Peso molecular del MgCl_2 : 203.31.
- Para preparar 4 ml de una solución 0.1 M de MgCl_2 , disolver en 4 ml de agua MilliQ:
 - MgCl_2 - 0.0813 g

10.2.3 D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

- Para IHQ, TUNEL, cultivo celular y ELISA.
- Disolver en 900 ml de agua MilliQ:
 - Cloruro de sodio (NaCl)- 8.0 g
 - Cloruro de potasio (KCl)- 0.2 g
 - Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)- 1.15 g
 - Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)- 0.2 g
- Ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico diluído.
- Aforar a 1L con agua MilliQ y filtrar en condiciones estériles.

10.2.4 D-PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+}

- Para cultivo de fibroblastos 3T3.
- Disolver en 900 ml de agua MilliQ:
 - Cloruro de sodio (NaCl)- 8.0 g
 - Cloruro de potasio (KCl)- 0.2 g
 - Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)- 1.15 g
 - Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)- 0.2 g
 - Cloruro de calcio (Ca_2Cl)- 0.1g
 - Cloruro de magnesio (Mg_2Cl)- 0.1g
- Ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico diluído.
- Aforar a 1L con agua MilliQ y filtrar en condiciones estériles.

10.2.5 DMEM 10% SFB

- Para cultivo de fibroblastos 3T3 y KC.
- Disolver en 900 ml de agua MilliQ:
 - Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) en polvo- 1 sobre
- Posteriormente agregar:
 - HEPES 1M- 2.5 ml
 - Penicilina 5000 U/ estreptomina 5000 µg- 10 ml
 - Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)- 3.7 g
- Ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico diluido.
- Aforar a 1L con agua MilliQ y filtrar en condiciones estériles.
- Una vez filtrado, poner 50 ml de SFB en dos botellas de 500 ml estériles y agregar 450 ml de DMEM.

10.2.6 EDTA 5 mM en D-PBS 50%/ RPMI 50%

- Para cultivo de monocitos.
- Primero, preparar un stock de EDTA 100 mM diluyendo en 100 ml de D-PBS:
 - EDTA - 2.925 g
 - Una lentejita de hidróxido de sodio (NaOH), para agilizar el proceso.
- Ajustar el pH con ácido clorhídrico diluido y filtrar.
- Para preparar 30 ml de EDTA 5 mM en D-PBS 50%/ RPMI 50%, mezclar:
 - EDTA 100 mM- 1.5 ml
 - D-PBS estéril- 13.5 ml
 - RPMI 10% SFB- 15 ml

10.2.7 HEPES calcio

- Para ensayo de anexina V-FITC y IP
- Para preparar HEPES-NaOH 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM y CaCl₂ 2.5 mM, disolver en 400 ml de agua MilliQ:

- HEPES- 1.192 g
- NaCl- 4.091 g
- CaCl₂ - 0.139 g
- Ajustar el pH a 7.4 con NaOH.
- Aforar a 500 ml con agua MilliQ.
- Filtrar en condiciones estériles y almacenar a 4°C.

10.2.8 Medio primario para KC

- Para cultivo de KC.
- Agregar a una botella de 100 ml:
 - DMEM 10% SFB- 75 ml
 - Ham's F12- 22.5 ml
 - SFB- 2.5 ml
 - Penicilina 5000 U/ estreptomina 5000 µg- 800 µl
 - Insulina- 12 U
 - Solución de adenina- 1 ml
 - Solución de hidrocortisona- 200 µl
 - Solución de triiodotironina (T3)- 100 µl
- Almacenar a 4°C, máximo 30 días.

10.2.8.1 Solución de adenina

- Agregar a 100 ml de agua MilliQ:
 - HCl 1N- 700 µl
 - Adenina- 0.182 g
- Filtrar en condiciones estériles.
- Hacer alícuotas de 1.2 ml y almacenar a -20°C.

10.2.8.2 Solución de hidrocortisona

- Diluir en 10 ml de DMEM:

- Stock de hidrocortisona- 400 μ l
- Hacer alícuotas de 150 μ l y almacenar a -20°C.
- Para preparar stock de hidrocortisona, disolver en 5 ml de etanol:
 - Hidrocortisona- 0.025 g
- Filtrar en condiciones estériles.
- Hacer alícuotas de 450 μ l y almacenar a -20°C.

10.2.8.3 Solución de T3

- Diluir en 1960 μ l de DMEM:
 - Stock de T3- 40 μ l
- Hacer alícuotas de 150 μ l y almacenar a -20°C.
- Para preparar stock de T3, mezclar el volumen mínimo necesario de NaOH 0.02N para poder disolver:
 - T3- 0.0136 g
- Agregar la mezcla a 100 ml de agua MilliQ y agitar.
- Filtrar en condiciones estériles.
- Hacer alícuotas de 50 μ l y almacenar a -20°C.

10.2.9 Medio final para KC

- Para cultivo de KC.
- Agregar a 50 ml de medio de cultivo 1°:
 - Penicilina 5000 U/estreptomicina 5000 μ g- 100 μ l
 - Glutamina- 500 μ l
 - Solución de EGF- 5 μ l
 - Solución de toxina del cólera- 50 μ l
 - Anfotericina B (Fungizone)- 500 μ l
- Almacenar a 4°C por 10 días máximo.

10.2.9.1 Solución de EGF

- Disolver en 10 ml de DMEM 10% SFB:
 - EGF- 1 g
- Hacer alícuotas de 15 μ l y almacenar a -20°C.

10.2.9.2 Solución de toxina del cólera

- Diluir en 1 ml de DMEM 10% SFB:
 - Stock de toxina del cólera- 10 μ l
- Almacenar a 4°C.
- Para preparar stock de toxina del cólera, disolver en 1.18 ml de agua MilliQ:
 - Toxina del cólera- 1 mg
- Almacenar a 4°C.

10.2.10 Paraformaldehído al 2% ó 4%

- Para dobles tinciones y TUNEL.
- Utilizar lentes de protección y cubrebocas.
- Poner 100 ml de D-PBS en un vaso de precipitados de vidrio y colocarlo sobre un agitador magnético con regulador de temperatura.
- Para preparar una solución al 2%, agregar 2 g de paraformaldehído. Para preparar una al 4%, agregar 4 g de paraformaldehído.
- Cubrir el vaso de precipitados con papel aluminio, subir la temperatura a 100°C y agitar hasta que se disuelva. Se puede agregar una lentejita de NaOH para agilizar el proceso.
- En cuanto se disuelva el paraformaldehído, poner el vaso en hielo para evitar que se precipite.
- Ajustar el pH a 7.4 con HCl.
- Filtrar y almacenar protegido de la luz a 4°C.
- Es preferible preparar solución fresca cada vez.

10.2.11 RPMI 1640 10% SFB

- Para cultivo de monocitos.
- Disolver en 900 ml de agua MilliQ:
 - RPMI 1640 en polvo- 1 sobre
- Posteriormente agregar:
 - Glutamina- 0.293 mg
 - Penicilina 5000 U/ estreptomina 5000 μg -10 ml
 - NaHCO_3 - 2g
- Ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico diluído.
- Aforar a 1L con agua MilliQ y filtrar en condiciones estériles.
- Una vez filtrado, poner 50 ml de SFB en dos botellas de 500 ml estériles y agregar 450 ml de RPMI 1640.

10.2.12 Solución bloqueadora para ELISA

- Primero, preparar una solución 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH):
 - NaOH- 40 g - 1L - 1N
- Para preparar una solución 0.1N de NaOH, agregar a 100 ml de agua MilliQ:
 - NaOH- 0.4g
- Poner sobre un agitador con regulador de temperatura y calentar.
- Cuando empiece a hervir, agregar lentamente:
 - Caseína- 5 g
- Agitar lentamente hasta que se disuelva.
- Dejar de calentar pero continuar la agitación y agregar lentamente 900 ml de PBS pH 7.2.
- Una vez que la solución se enfríe, ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico diluido (en una concentración 5 M se agrega aproximadamente 1 ml).
- Hacer alícuotas de 40 ml y congelar a -20°C

10.2.13 Solución bloqueadora para IHQ

- Para preparar una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y tritón X-100 al 0.1% en D-PBS, agregar a 10 ml de D-PBS estéril:
 - BSA - 0.1 g
 - Tritón X-100- 10 μ l
- Disolver bien y filtrar.
- Es preferible preparar solución fresca cada vez.

10.2.14 Solución de permeabilización

- Para TUNEL.
- Para preparar una solución de D-PBS con citrato de sodio al 0.1% y tritón X-100 al 0.1%, disolver en 10 ml de D-PBS pH 7.2:
 - Citrato de sodio - 0.01 g
 - Tritón X-100- 10 μ l
- Utilizar a 4°C.
- Preparar solución fresca cada vez.

10.2.15 Solución para diluir el anticuerpo de detección

- Para ELISA.
- Albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20.
- Disolver en 100 ml de PBS pH 7.2:
 - Albúmina bovina- 1g
 - Tween 20- 50 μ l
- Filtrar y almacenar a 4°C.

10.2.16 Solución para lavar placas

- Para ELISA.
- Para preparar una solución de Tween 80 al 0.01% en PBS 1x, agregar a cada litro de PBS pH 7.2:

- Tween 80- 100 μ l
- Agitar suavemente
- Filtrar y almacenar a 4°C.

10.2.17 Tripsina 0.1%/EDTA 0.02%

- Para cultivo de KC.
- Diluir en 21.5 ml de D-PBS estéril:
 - Tripsina 10x- 1 ml
 - EDTA 0.2%- 2.5 ml
- Almacenar a 4°C por no más de una semana.
- Para preparar el EDTA 0.2%, disolver en 100 ml de D-PBS:
 - EDTA- 0.2 g
- Agitar hasta que se disuelva por completo. Para agilizar el proceso se le puede agregar una lentejita de NaOH.
- Ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico.
- Filtrar en condiciones estériles y almacenar a 4°C.