



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA**

**“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE
ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS
ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON
PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”**

TESIS DE POSGRADO

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

P R E S E N T A :

DR. HÉCTOR EDUARDO LÓPEZ LOZANO

**ASESOR DE TESIS:
DR. ANDRÉS TIRADO SÁNCHEZ**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO:
DRA. ROSA MARÍA PONCE OLIVERA**



MÉXICO, D.F.

2011



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.

**“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA
CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA
3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”**

**DR. FRANCISCO GONZÁLEZ MARTÍNEZ
JEFE DE ENSEÑANZA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.**

**DRA. ROSA MARÍA PONCE OLIVERA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO EN DERMATOLOGÍA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.**

TUTOR DE TESIS

DR. ANDRÉS TIRADO SÁNCHEZ

MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

Y DERMATO-ONCOLOGÍA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

COTUTOR DE TESIS

DRA. ROSA MARÍA PONCE OLIVERA

JEFE DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DERMATOLOGÍA UNAM

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

AUTOR DE TESIS

DR. HÉCTOR EDUARDO LÓPEZ LOZANO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo, comprensión y cariño durante estos años, los cuales me han dado la fortaleza para llegar a este momento.

A mis maestros del Servicio de Dermatología, Dermato-Oncología, Micología y Dermato-Patología, por darme la oportunidad de formarme con ellos y por sus enseñanzas, tanto en lo profesional como en lo personal.

HELL

ÍNDICE

RESUMEN ESTRUCTURADO	1
PARTE I. MARCO TEÓRICO	
1.1. Pénfigo vulgar, antecedentes	5
PARTE II. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Planteamiento del problema	13
2. Justificación	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	16
5. Diseño del estudio	16
6. Metodología	17
6.1 Lugar dónde se realizó el estudio	17
6.2 Universo, muestra y tamaño de la muestra	17
6.3 Método de selección de los participantes	18
6.4 Criterios de selección	18
6.4.1 Criterios de inclusión	18
6.4.2 Criterios de no inclusión	19
6.5 Procedimiento	19
6.6 Variables del estudio	23
6.7 Técnicas de análisis estadístico	24

7. Recursos	25
8. Aspectos éticos y de bioseguridad	26
9. Relevancia y expectativas	26
10. Resultados	27
11. Discusión	34
12. Conclusiones	38
PARTE III. ANEXOS	
Anexo 1. Consentimiento informado	43
Anexo 2. Hoja de recolección de datos de paciente	49
Anexo 3. Procedimiento para la recolección de muestra	50
Anexo 4. Cartas de aprobación del Comité de Ética e Investigación	52
PARTE IV. REFERENCIAS	55

I. RESUMEN ESTRUCTURADO

I.I ANTECEDENTES. El Pénfigo Vulgar (PV) es una patología crónica, grave, de etiología autoinmune, que forma parte de las enfermedades ampollosas de la piel y las mucosas. Su presentación puede variar en el grado de severidad llegando a provocar en algunos casos la muerte. En los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones con la finalidad de tener un mayor conocimiento de la fisiopatología de este proceso de acantolisis y poder detectar los antígenos que están involucrados en su presentación. Uno de ellos son los receptores de acetilcolina, presentes en la superficie de los queratinocitos y que pueden reforzar la adhesión intercelular de éstos, incluso cuando la desmogleína ha sido destruída. La presencia de los anticuerpos contra estos receptores podría estar jugando un papel importante como disparador de la actividad del PV y llevar una relación directa con la severidad clínica de esta dermatosis. No obstante no hay estudios que evalúen dicha asociación.

I.II JUSTIFICACIÓN. De encontrarse que la concentración plasmática de estos anticuerpos se correlaciona con la severidad mucocutánea y con los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3 en los pacientes con PV, representaría una herramienta que permitiría un mejor monitoreo de la actividad de la enfermedad, permitiendo la utilización de terapias que evitarían brotes severos de esta dermatosis, o incluso podría justificar ensayos clínicos basados en este hecho. La menor frecuencia de estos brotes severos redundaría en una reducción de los costos de hospitalización y el índice de morbilidad en la enfermedad.

I.III HIPÓTESIS. Las concentraciones plasmáticas de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina en el paciente con PV se correlacionan con la severidad clínica de la enfermedad y con los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3.

I.IV OBJETIVO. Determinar el valor de las concentraciones plasmáticas del anticuerpo contra receptor de acetilcolina y su relación con la actividad del PV y con los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3.

I.V DISEÑO Y DURACIÓN. Se realizó un estudio prospectivo, transversal y analítico en la población de Consulta Externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México con diagnóstico de PV.

I.VI MATERIAL Y MÉTODOS. Para el estudio se incluyeron pacientes que cumplieran con los criterios de selección. Se evaluaron clínicamente 7 pacientes con PV de la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México. Previa autorización del consentimiento informado, se determinaron las siguientes variables: edad, género, superficie corporal afectada, así como la obtención de una muestra de sangre periférica de 10mL, para la determinación de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y de anticuerpos antidesmogleína 3.

I.VII VARIABLES. Dentro de las variables, se incluyeron edad, género, concentración plasmática de los anticuerpos y superficie corporal afectada como parámetro de la severidad clínica de los pacientes afectados.

I.VIII PROCEDIMIENTO. Los pacientes fueron seleccionados de la consulta externa del Servicio de Dermatología por presentar PV. Previa autorización por parte del paciente, se procedió a realizar el interrogatorio dirigido y la exploración física, con la medición de la superficie corporal afectada en el grupo de pacientes con PV y toma de una muestra de sangre periférica de 10mL.

I.IX CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES. La selección, estudio de los pacientes y análisis de los resultados, se llevaron a cabo de marzo a septiembre de 2010.

I.X ANÁLISIS DE RESULTADOS. Se aplicó la regresión lineal simple para el análisis de la relación entre los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, anticuerpos antidesmogleína 3 y la superficie corporal afectada como medida de severidad clínica. Se utilizó el programa SPSS ver.17 para Windows para el análisis estadístico.

I.XI RESULTADOS. Se encontró una correlación de 78% para anticuerpos contra receptor de acetilcolina y 85% para anticuerpos antidesmogleína 3. El 47% ($R^2=46.75$) de las variaciones en la superficie corporal afectada se explicarían por los valores de los anticuerpos contra receptor de acetilcolina, mientras que 59% ($R^2=59.25$) de las variaciones en la severidad de la enfermedad se explicarían por los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3. Se observó una correlación del 80% entre los niveles de ambos anticuerpos; además de que se detectó que el 65% ($R^2=65.35$) de las variaciones en los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3 se explican por los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina.

I.XII CONCLUSIONES. Los niveles del anticuerpo anti-receptor de acetilcolina mostraron una correlación acentuada con la severidad clínica, aunque los anticuerpos antidesmogleína 3 presentaron una alta correlación, con dependencia lineal con la severidad clínica en los pacientes con PV. Los 2 anticuerpos muestran una buena correlación y dependencia lineal en sus variaciones.

I.XIII PALABRAS CLAVE. Anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, pénfigo vulgar, severidad clínica, superficie corporal afectada, enfermedad ampollosa autoinmune.

PARTE I. MARCO TEÓRICO

1.1 PÉNFIGO VULGAR. ANTECEDENTES

La palabra pénfigo describe un grupo de enfermedades ampollosas de evolución crónica, originalmente descritas por Wichman en 1792. Este término deriva del vocablo griego *pemphix*, el cual significa burbuja o ampolla^{1,4,5}. Este grupo de enfermedades ampollosas autoinmunes está caracterizado histológicamente por la presentación de vesículas intraepidérmicas e inmunopatológicamente por el hallazgo de anticuerpos circulantes y unidos a la superficie celular de los queratinocitos, del tipo IgG. Las tres divisiones principales de pénfigo incluyen al pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo y pénfigo paraneoplásico^{2,5,6}. Cada tipo de pénfigo tiene hallazgos clínicos e inmunopatológicos particulares. El pénfigo vulgar (PV) es el grupo principal de este tipo de dermatosis autoinmunes, el cual afecta la piel y las mucosas y se caracteriza por la presencia de ampollas de pared flácida, las cuales, al romperse, dejan erosiones o exulceraciones que pueden llegar a afectar grandes extensiones del cuerpo, con alteración del estado general y un alto índice de morbi-mortalidad si no se instala un tratamiento adecuado precozmente^{1,3,5}. El PV en particular, constituye aproximadamente el 70-80% de todos los casos de pénfigos. La presentación inicial de esta grave dermatosis es a menudo mediante la aparición de ampollas o vesículas orales, las cuales se erosionan o exulceran y son seguidas, en un periodo de semanas a meses, del desarrollo de las lesiones cutáneas^{7,11}.

La frecuencia exacta del PV a nivel mundial es desconocida. Es una enfermedad rara, con una incidencia aproximada de uno a cinco casos por millón de habitantes al año^{2,9,13}. Esta dermatosis se ha descrito en todas las razas, encontrándose una frecuencia mayor en los judíos asquenazíes (16 a 32 casos por millón de habitantes al año) y en Japón. En Estados Unidos algunas series indican que la incidencia del PV es de 0.5-1 por millón de habitantes por año.^{6,7} En México no hay estudios de incidencia o prevalencia, aunque a nivel hospitalario vemos una frecuencia en aumento. La enfermedad puede presentarse por igual en los dos sexos, principalmente entre los quinta y séptima décadas de la vida, aunque se han reportado casos desde los 18 meses hasta los 89 años^{2,4,5}.

Histopatológicamente, las lesiones establecidas de PV son ampollas suprabasales con acantolisis (separación entre los queratinocitos). Estos hallazgos pueden extenderse hasta afectar estructuras anexiales. Las células basales pierden sus puentes intercelulares pero permanecen unidas a la membrana basal^{11,21}. La ampolla usualmente contiene algunas células acantolíticas, las cuales a menudo muestran cambios degenerativos. Ocasionalmente, unos pocos eosinófilos o neutrófilos están presentes en la cavidad formada^{23,28}. A la inmunofluorescencia directa e indirecta se detectan auto-anticuerpos dirigidos contra un complejo de antígenos blanco (antidesmogleína) localizados en el epitelio escamoso estratificado, principalmente del tipo IgG.^{4,5,7}

Los criterios clínicos, histológicos e inmunológicos que sirven para el diagnóstico de PV son los siguientes: presencia de ampollas flácidas y erosiones, signo de Nikolsky

positivo (desprendimiento de la epidermis aparentemente sana al presionarla lateralmente en forma suave con el dedo)⁸, úlceras superficiales en las mucosas, sobre todo la bucal y alteraciones del estado general. Los criterios histológicos son presencia de una ampolla intraepidérmica suprabasal con acantolisis. Los criterios inmunológicos por inmunofluorescencia directa son depósitos de IgG a nivel intercelular en la epidermis, dando una imagen en “panal de abeja”.^{4,5}

En más de dos terceras partes de los casos, la enfermedad empieza afectando a las mucosas. La más frecuentemente involucrada es la cavidad bucal, en la cual se puede observar la aparición de ampollas de pared flácida, de evolución fugaz, las cuales dejan exulceraciones de fondo eritematoso^{24,31}. Estas lesiones pueden afectar el paladar, las encías y la mucosa yugal, siendo persistentes y dolorosas, pudiendo esto último condicionar la vía oral del paciente y ser un factor determinante para su ingesta y estado general, ya que llevan a un estado de desnutrición al dificultar la alimentación^{2,38}. La afección oral puede ser la única manifestación de la enfermedad durante meses, hasta que aparecen las lesiones cutáneas. En algunos casos las alteraciones se limitan a la boca, aunque el PV se puede manifestar en otras mucosas. El involucro cutáneo suele observarse varias semanas o meses después de las erosiones iniciales en mucosas^{2,14,33}. La afección en piel caracteriza por la aparición de ampollas de pared flácida o blanda, de contenido seroso, frágiles y que rápidamente se exulceran dejando erosiones de fondo eritematoso. Las ampollas pueden confluir y formar amplias zonas de exulceración. El signo de Nikolsky es positivo en las zonas cercanas a las ampollas y a veces en piel sana. Las lesiones se pueden localizar o generalizar y predominan en los puntos de presión, en los grandes

pliegues, cara, piel cabelluda y extremidades, con frecuente afección periungueal. Las exulceraciones son dolorosas, presentando una re-epitelización lenta y dejando manchas hiperpigmentadas residuales^{8,25,32}.

El PV tiene una evolución espontánea y es habitualmente grave por la aparición de complicaciones asociadas a la desnutrición, la ruptura de la barrera cutánea, desequilibrio hidro-electrolítico y sobreinfección. La tasa de remisión espontánea a largo plazo es inferior al 15-20%^{13,22}. Desde el advenimiento de la terapia con esteroides sistémicos, el pronóstico del PV ha cambiado importantemente. La mortalidad de esta enfermedad pasó a ser del 75-80% a la actual, que se estima se encuentra entre 5 y 15%. A pesar de esto, las complicaciones del tratamiento inmunosupresor también constituyen una causa de morbi-mortalidad para estos pacientes^{8,13}.

En esta enfermedad se rompe una premisa básica de la inmunología: la auto-tolerancia; ya que existe la formación de un auto-anticuerpo circulante que reacciona contra componentes del organismo, modificándolo e induciendo acantolisis.¹⁰ Al perderse este mecanismo de auto-tolerancia se crea un proceso llamado autoinmunidad, que es la característica fisiopatológica e histológica del PV.^{3,9}

El mecanismo de autoinmunidad se ve favorecido por la susceptibilidad genética, que actualmente se considera un proceso multifactorial, ya que no todos los individuos con genotipo susceptible presentan estas alteraciones.^{3,9} Para el desarrollo de este mecanismo se ven involucrados una serie de procesos simultáneos, como la

activación de células T y B, la pérdida de la supresión inmunológica, los efectos hormonales y los factores genéticos.^{6,9}

La primera fase para el desarrollo de la autoinmunidad inicia con la captación del antígeno (una glicoproteína llamada desmogleína, presente en los desmosomas de la epidermis) por la célula presentadora^{11,12}. Dicha célula internaliza, procesa y presenta este antígeno proteico a la célula T cooperadora, que proporciona una segunda señal de activación en forma de moléculas de adherencia de la superficie celular. Las células T cooperadoras producen citoquinas como IL-4, 5, 8, 10 e IFN γ , que activan a las células B. Las células B así activadas, entran a la fase G1 del ciclo celular e inician la producción de IgM, cambiando todos los isotipos de IgG que interactúan con los antígenos del desmosoma (desmogleína), induciendo la acantolisis^{6,7,10,13}.

Los anticuerpos del pénfigo vulgar son detectables tanto unidos a la superficie de los queratinocitos de las lesiones epidérmicas como en el suero de los pacientes afectados^{1,3}. Los títulos séricos de inmunoglobulina G usualmente se correlacionan con la extensión y la actividad del pénfigo vulgar^{3,11}. Los antígenos epidérmicos reconocidos por anticuerpos en los pacientes con esta dermatosis han sido identificados como glicoproteínas de 130 kDa, las cuales son conocidas como “complejo PV”^{5,21}.

El ADN (ácido desoxirribonucleico) que codifica los antígenos del pénfigo vulgar se ha clonado y secuenciado, identificando el antígeno como desmogleína 3 (Dsg3), un

tipo de glicoproteína integral de membrana tipo I que pertenece a la familia de las cadherinas, una familia de moléculas de adhesión dependientes de calcio^{2,14}.

La Dsg3 es un constituyente de la región extracelular de desmosomas, las cuales son uniones intercelulares dinámicas, esenciales para la manutención de la integridad celular^{3,7}. Parece ser que la IgG del pénfigo vulgar reconoce los epítomos conformacionales de la Dsg3, los cuales se piensa que contienen las secuencias más importantes para la adhesión intercelular mediada por caderinas^{14,20}. Del 50 al 75% de los pacientes con pénfigo vulgar también presentan anticuerpos contra desmogleína 1, por lo que también son reconocidos como patogénicos²².

Además de estos anticuerpos, en los últimos años se han encontrado algunos antígenos que representan otras moléculas de adhesión que no pertenecen a las desmogleínas^{23,25,30}. Dentro de estos, se encuentran las desmocolinas, desmoplaquinas, colágeno XVII/BP180, anexinas de receptores de acetilcolina del queratinocitos, pemfaxina o molécula similar a la anexina y la cadena alfa del receptor de alta afinidad de IgE^{4,16,18}. Parece ser que el fenómeno de acantolisis está relacionado a una serie de citoquinas, como la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral α , IL-6, IL-10, aunque esta asociación no es muy clara^{10,17}.

La patogénesis de la acantolisis puede deberse a dos mecanismos diferentes; el primero en el cual la explicación fisiopatológica de la pérdida de la unión intercelular de los queratinocitos es la inhibición directa de las funciones de adhesión^{25,29}. En segundo lugar, la alteración del contacto intercelular es debida a procesos más

complejos que son posteriores a la interacción entre los anticuerpos contra el pénfigo vulgar y las desmogleínas, con secreción o activación de proteasas, las cuales son responsables de la acantolisis^{28,30}.

En tiempos recientes, se le ha dado atención al rol fisiopatológico de los antígenos no-desmogleína, como los receptores de acetilcolina y la pemfaxina, pertenecientes al eje colinérgico, en el cual la acetilcolina como “citotransmisor” está involucrada en el control de la adhesión queratinocito-queratinocito^{5,13}.

En 1963, Whittaker estableció que la acetilcolina está presente en tejidos no pertenecientes al sistema nervioso y que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo^{15,24}. Los queratinocitos epiteliales humanos son miembros de una red de señalización no-neurológica que tiene influencia en la mediación de la comunicación intercelular en la piel, en la cual la acetilcolina como cito-transmisor actúa como una hormona local o una citoquina^{9,21}. La acetilcolina no neuronal es sintetizada, secretada y degradada en los queratinocitos, y tiene una gran variedad de efectos biológicos en estas células, ya que puede activar simultáneamente diferentes vías de señalización intracelular^{7,16}.

La actividad de la acetilcolina se ha relacionado con diversos eventos bioquímicos, lo cual en conjunto con otros efectos acumulativos hormonales y estímulos ambientales, determinan complejos cambios a nivel tisular^{18,26}.

Se ha descrito que la acetilcolina es responsable de diversos efectos en la proliferación de queratinocitos, en su migración y diferenciación, además de su

influencia en la adhesión intercelular^{4,11}. La activación de los receptores de acetilcolina puede afectar las vías de señalización que regulan la expresión o función de moléculas de adhesión en algunos tipos celulares, además del estado de fosforilación proteica^{15,23}.

Nguyen y colaboradores han demostrado que los receptores de acetilcolina de los queratinocitos pueden regular la adhesión de los desmosomas, alterando la expresión de los niveles de desmogleínas 1 y 3 y el estado de fosforilación de esta última^{2,8}.

Se ha reportado que aproximadamente 85% de los pacientes con pénfigo desarrollan anticuerpos contra los receptores de acetilcolina de los queratinocitos, los cuales se han identificado como el receptor de acetilcolina 9, un homopentámero que regula la adhesión en células epiteliales y una anexina de 75kDa llamada pemfaxina o anexina 31, la cual actúa como receptor de acetilcolina^{4,13}.

Estos hallazgos sugieren que la acetilcolina y sus receptores pueden estar involucrados en el mecanismo que conduce a la acantolisis, dando una nueva perspectiva de la enfermedad, su posible importancia para su evaluación clínica y tratamiento^{21,25,27}.

PARTE II. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la relación de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina con la severidad clínica en los pacientes con pénfigo vulgar en base a la superficie corporal afectada y su correlación con los niveles de anticuerpos anti-desmogleína 3?

Dentro del estudio de la fisiopatología del PV, se han ido identificando auto-anticuerpos diferentes a los clásicamente ligados a esta enfermedad, los ampliamente conocidos anticuerpos contra las desmogleínas. El valor clínico y etiológico de estos anticuerpos no-desmogleína aún se encuentra en estudio, y su importancia para la valoración de los pacientes con PV no se ha determinado objetivamente.

Los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina forman parte de estos auto-anticuerpos identificados recientemente en las personas con PV. Se ha encontrado que la acetilcolina juega un papel importante en la fisiología del queratinocito y en la adhesión entre estas células epidérmicas. En algunos trabajos de investigación se ha reportado que hasta 85% de los pacientes con PV desarrollan anticuerpos contra el receptor de acetilcolina.

El propósito de este trabajo es tratar de identificar si la presencia de estos anticuerpos en los pacientes con PV tiene relación con la severidad clínica de los

mismos, además de tratar de correlacionar los niveles de éstos con los de anticuerpos anti-desmogleína 3. Esta información podría ser de gran utilidad, ya que se podría contar con un nuevo parámetro serológico para la valoración de los pacientes con PV, además de darnos más información sobre la fisiopatología de esta dermatosis.

2. JUSTIFICACIÓN

El monitoreo periódico de los pacientes con pénfigo para evaluar su severidad se basa principalmente en la valoración clínica (porcentaje de superficie corporal afectada) y en la determinación de anticuerpos antidesmogleínas en suero por inmunofluorescencia indirecta o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Los trabajos sobre anticuerpos anti-receptor de acetilcolina en pacientes con pénfigo vulgar están enfocados en la mayoría de los casos en los aspectos etiológicos y fisiopatológicos de la enfermedad, para la cual se han encontrado diferentes tipos de anticuerpos relacionados, además de los tradicionalmente asociados como los anticuerpos anti-desmogleína 3.

Los estudios sobre la importancia clínica de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina son escasos en la literatura consultada, por lo que tratar de encontrar una relación clínica entre éstos y hallazgos clínicos, como la superficie corporal afectada en este tipo de pacientes, sería de gran utilidad para tener un parámetro de severidad para el seguimiento de la enfermedad.

Debido a esto, se pretende que con este estudio podamos tener un marco de referencia más amplio sobre este tema en nuestro país, que justifique la medición rutinaria del anticuerpo en estos pacientes, realizar estudios más amplios simultáneos con anticuerpos dirigidos a desmogleínas y otras estructuras del queratinocitos o de la unión entre los mismos.

En este trabajo se plantea que los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina podrían llegar a ser otra opción para la valoración serológica del paciente con PV, tratando de relacionar sus niveles con la severidad clínica de la misma enfermedad y con los niveles de los anticuerpos anti-desmogleína 3, utilizados actualmente para el diagnóstico y valoración de esta dermatosis.

3. HIPÓTESIS

Los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina se asocian con la severidad clínica en los pacientes con pénfigo vulgar, además de correlacionarse con los niveles de los anticuerpos anti-desmogleína 3.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de los anticuerpos contra receptor de acetilcolina con la severidad clínica, además de su relación con los niveles de anticuerpos anti-desmogleína 3, en pacientes con pénfigo vulgar de la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Conocer los valores de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina en la población mexicana con pénfigo vulgar.
- B. Correlacionar los niveles de anticuerpos contra receptor de acetilcolina con la severidad clínica de la enfermedad.
- C. Correlacionar los niveles de anticuerpos contra receptor de acetilcolina con los de anticuerpos anti-desmogleína 3 en los pacientes con pénfigo vulgar.

5. DISEÑO DEL ESTUDIO

5.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Prospectivo.

5.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Observacional.

5.3 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

5.3.1 Con relación al Método de Observación.

Transversal.

5.4 TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO GENERAL

Analítico.

La duración del estudio, de acuerdo con el cronograma de actividades, fue de 6 meses contados a partir de la autorización del proyecto de investigación por el comité de Investigación y Ética de nuestra Institución.

6. METODOLOGÍA

6.1 LUGAR EN DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO

Consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México O.D.

Laboratorio de investigación de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

6.2 UNIVERSO, MUESTRA Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los pacientes atendidos en la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México, que contaban con el diagnóstico de pénfigo vulgar en base a criterios clínicos, inmunológicos e histopatológicos^{6, 8, 10}, cuya selección se realizó en base a criterios de inclusión y no inclusión mediante la unidad de análisis y observación; todo esto a partir de la aprobación de este protocolo. Los pacientes fueron valorados por parte de los investigadores de este estudio. El procesamiento de las muestras de sangre se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, con recursos de esa institución.

Se captaron 7 pacientes con diagnóstico de PV de la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México. Previo consentimiento informado por parte de los mismos, se realizó la valoración clínica de la superficie corporal afectada, la toma de muestra de sangre para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y anti-desmogleína 3, además de la captura de datos epidemiológicos y de la historia clínica dermatológica.

6.3 MÉTODO DE SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES

Se llevó a cabo una selección de siete pacientes de la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México, quienes contaran con el diagnóstico de Pénfigo vulgar y que cumplieran con los criterios de selección que se especificarán a continuación.

6.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.4.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con Pénfigo vulgar diagnosticados por criterios clínicos, histológicos e inmunológicos.
2. Pacientes que cuenten con registro en la Consulta Externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México.
3. Género masculino o femenino.

4. Individuos que aceptaron incluirse en el estudio, previa información detallada del mismo, confirmándose su decisión mediante la firma del Consentimiento Informado que se les proporcionó por escrito, ya sea del paciente o su representante legal.

6.4.2 Criterios de no inclusión

1. Individuos que no aceptaron participar en el estudio.
2. Pacientes que de forma concomitante cursen con otra enfermedad autoinmune (Lupus eritematoso generalizado, psoriasis, artritis reumatoide, liquen escleroso y atrófico, dermatitis herpetiforme, artritis reumatoide juvenil, dermatomiositis, etc.).
3. Pacientes con diagnóstico de miastenia gravis o de alguna miopatía inflamatoria inmunológica o no.

6.5 PROCEDIMIENTO

6.5.1 Enrolamiento de pacientes

Los pacientes fueron seleccionados de la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México en base a criterios de selección, especificados en el apartado 6.4.

6.5.2 Interrogatorio, toma de muestra y procesamiento de la misma

Al considerar al paciente como apto para el estudio, se le realizó una entrevista dirigida, dónde se interrogó y explicó a la persona con PV acerca del consentimiento informado para su participación en el estudio (Anexo 1). Se tomó una muestra de sangre de 10 mL (Para la determinación de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y anti-desmogleína 3) de manera aséptica (Anexo 3). La muestra se centrifugó antes de transcurrir una hora y se conservó el plasma en criotubos de 3mL a -20 a -30° C

6.5.3 Valoración de los pacientes con Pénfigo Vulgar

Se realizó la medición de la superficie corporal afectada en los pacientes con PV, por lo que se requirió de interrogatorio clínico y exploración física dermatológica dirigida.

6.5.4 Determinación de anticuerpos

Las concentraciones de los anticuerpos se cuantificaron del plasma de sangre obtenida por punción periférica, al momento de aceptar el paciente participar en el estudio.

Anticuerpos Anti-receptor de acetilcolina.

El volumen de sangre obtenido fue de 10mL y se depositó en tubos con EDTA (tubo de biometría hemática), los cuales se centrifugaron para la obtención del plasma, que se almacenó en tubos de polipropileno (criotubos) a -20 a -30° C, hasta su análisis en el laboratorio de Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

La determinación de las concentraciones de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina se realizó por método de Radioinmunoensayo con el *Acetylcholine receptor Ab KiT IB68400, In-vitro Kit*. En esta técnica, se toma como principio que los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina son detectables por radio-unión, seguida de la precipitación de los mismos. Las muestras de los pacientes se incubaron con anticuerpos anti-receptor de acetilcolina marcados con ^{125}I - α -bungarotoxin. Los compuestos resultantes se inmunoprecipitaron con IgG anti-humano. Después de la centrifugación, el supernadante es aspirado y los complejos anticuerpo:anti-receptor de acetilcolina se contabilizaron por *gamma-counter*.

Anticuerpos Antidesmogleína 3

La determinación de las concentraciones de anticuerpos antidesmogleína 3 se realizó con el método de ELISA, con placas recubiertas con anticuerpo monoclonal de ratón específico para desmogleína 3.

Los reactivos se conservaron en refrigeración entre 2 y 8° C, pero al momento de utilizarlos se tienen a temperatura ambiente (15-30° C). El estuche para anticuerpos antidesmogleína 3, *Enzyme Immunoassay Quidel*, San Diego California, USA, contiene una placa de microtitulación con 12 x 8 pozos, estándar A, B y C; control alto y bajo, solución de lavado, diluyente de muestra, conjugado Dsg3, substrato concentrado, diluyente de substrato y una solución para detener la reacción.

Se preparó la solución de lavado, con una dilución 1:40 de la muestra de suero con diluyente de muestra, para posteriormente preparar una dilución 1:25 de los controles bajo y alto de desmogleína 3 con diluyente de muestra; la solución de substrato se preparó antes de usarla.

Se preparó la placa de microtitulación rehidratando los pozos agregando 300 µL de la solución de lavado usando un sistema automático (*Organon Technika, microwell system waster 430*) para llenar los pozos durante el proceso. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, retirándose el líquido de cada pozo, y para retirar el líquido restante se invirtió la placa sobre un papel absorbente. Posterior a esto, se agregaron 100 µL de diluyente de muestra para el pozo que fue usado como blanco, realizándose por duplicado al añadir 100 µL de cada estándar Dsg3 (A, B y C) y controles con dilución (alto y bajo); se añadió 100 µL de muestra diluida. Se incubó a temperatura ambiente por 60 +- 1 min. Se procedió a lavar cinco veces los pozos de la placa.

Se agregó en cada pozo, incluyendo el blanco, 50 μ L de desmogleína 3 conjugado. Se incubó a temperatura ambiente por 60 \pm 1 min y se preparó la solución de sustrato durante esta incubación. Se procedió a lavar 5 veces los pozos de la placa. Se añadió en cada pozo 100 μ L de solución de sustrato. Se incubó a temperatura ambiente por 30 \pm 1 min. Se añadió en cada pozo 50 μ L de solución para detener la reacción y se realizó la medición de absorbancia a 405 nm en el lector automatizado.

6.6 VARIABLES DEL ESTUDIO

- Severidad mucocutánea del Pénfigo vulgar
 - ▣ Categoría.- Cuantitativa.
 - ▣ Escala de medición.- Discreta.
 - ▣ Unidad de medición.- Unidades (índice).
 - ▣ Operacionalización.- La severidad se evaluó por medio de la aplicación del porcentaje de superficie corporal afectada por la enfermedad.

- Edad
 - ▣ Categoría.- Cuantitativa.
 - ▣ Escala de medición.- Escala numérica.
 - ▣ Unidad de medición.- Años cumplidos al momento del estudio.

- Género
 - ▣ Categoría.- Cualitativa.
 - ▣ Escala de medición.- Nominal (dicotómica).
 - ▣ Unidad de medición.- Masculino/Femenino.

- Concentración plasmática de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina
 - ▣ Categoría.- Cuantitativa.
 - ▣ Escala de medición.- Continua, de razón.
 - ▣ Unidad de medición.- *nmol/L* mediante técnica de radioinmunoensayo.

- Concentración plasmática de anticuerpos anti-desmogleína 3
 - ▣ Categoría.- Cuantitativa.
 - ▣ Escala de medición.- Continua, de razón.
 - ▣ Unidad de medición.- *U//L* mediante técnica de ELISA.

6.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.7.1 Objetivo.- Determinar el valor de las concentraciones plasmáticas de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y su asociación con la severidad clínica de pacientes con PV en base al porcentaje de superficie corporal afectada.

Técnica Estadística.- Se realizó una prueba de regresión lineal para evaluar la relación entre estos parámetros, con determinación de coeficiente de correlación y de determinación.

6.7.2 Objetivo.- Determinar el valor de las concentraciones plasmáticas de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y su correlación con los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3.

Técnica Estadística.- Se realizó una prueba de regresión lineal para evaluar la relación entre estos parámetros, con determinación de coeficiente de correlación y de determinación.

7. RECURSOS

Los recursos (el reactivo y el material de obtención de la muestra de sangre como jeringas, tubos de Vacutainer, etc., además de la papelería necesaria para las hojas de colección de datos, lápices y plumas), fueron financiados por el Investigador responsable. En el caso del equipo para procesar las muestras, todos los análisis se realizaron de manera gratuita en el laboratorio de Investigación del Instituto Politécnico Nacional.

Debido a que se requirió de una única valoración clínica, durante la cual se tomó la muestra de sangre necesaria para la determinación de anticuerpos, sólo se necesitó la exención del pago de dicha consulta por parte del Hospital (1 consulta exenta por paciente).

8. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Se garantizó la autonomía del paciente solicitando la firma de una carta de consentimiento informado, así como la confidencialidad de los datos obtenidos y su derecho a no participar en el estudio, sin que esto redunde en la calidad de su atención.

La investigación se clasifica como de riesgo mínimo. La venopunción se efectuó con técnica de asepsia para evitar contaminación e infecciones; en la menor parte de los casos se tomó de un catéter intravenoso. El proyecto se sometió a consideración del Comité de Investigación y Ética del Hospital General de México, con autorización por parte del mismo para su realización.

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

9. RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se pretende aportar información actual sobre de la etiopatogenia del pénfigo vulgar y de la importancia clínica que pueden llegar a tener los anticuerpos anti-acetilcolina en cuanto a la severidad de esta grave dermatosis.

10. RESULTADOS

Pacientes

Se incluyeron 7 pacientes, 4 (57%) del género femenino y 3 (43%) del masculino, presentando una edad promedio de 48 ± 8.52 años (intervalo 35-58 años), con una media de los valores de anticuerpo anti-receptor de acetilcolina de 2.75 ± 1.2 nmol/L (intervalo 1.23-3.99 nmol/L) y de anticuerpos antidesmogleína 3 de 123.85 ± 66.67 UI/L (intervalo 65.22-235.1 UI/L). La severidad clínica promedio fue de $47.43 \pm 17.29\%$ (intervalo 34-78%). (Tabla 1).

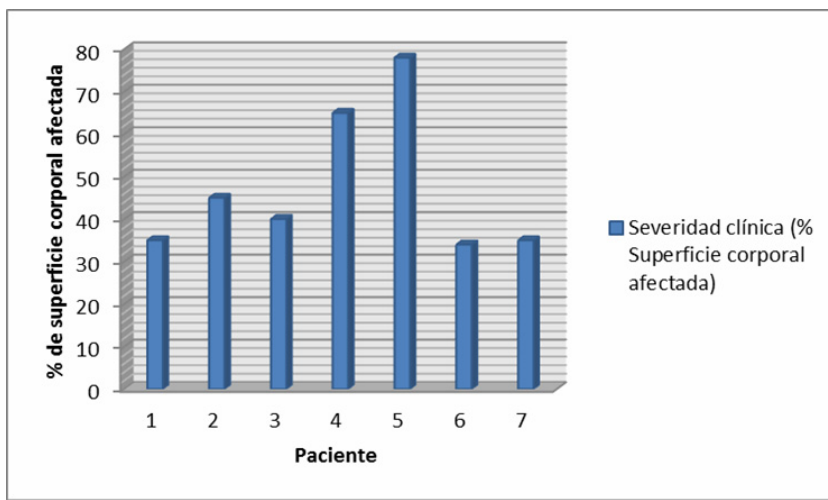
Sujetos de estudio (n=7)	Severidad clínica (%)	aAChr (nmol/L)	aDsg3 (UI/L)
1	35	1.63	85.43
2	45	3.85	140.97
3	40	1.23	66.74
4	65	3.95	189.18
5	78	3.99	235.1
6	34	1.8	65.22
7	35	2.82	84.32

aAChr= Anticuerpos anti-receptor de acetilcolina.

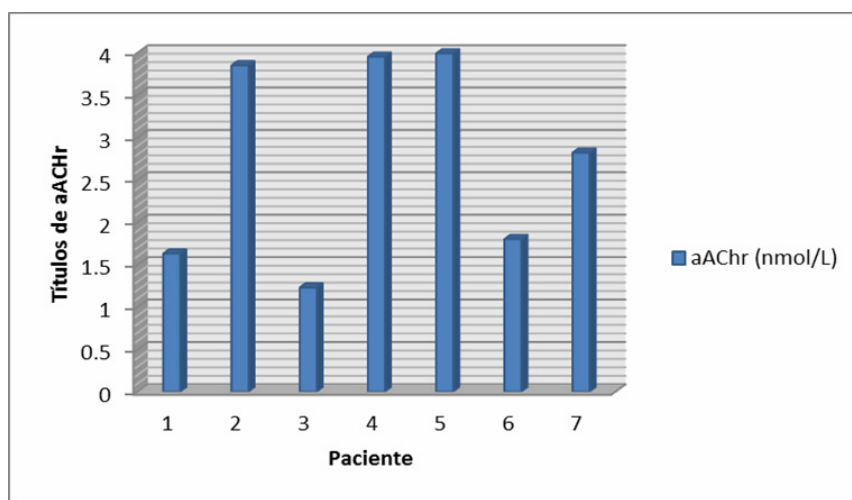
aDsg3= Anticuerpos antidesmogleína 3.

Tabla 1. Distribución individual de los datos.

A continuación se presentan las gráficas que representan los porcentajes de superficie corporal afectada (gráfica 1), los títulos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina (gráfica 2) y de los anticuerpos anti-desmogleína 3 (gráfica 3) en los 7 pacientes analizados en el estudio.

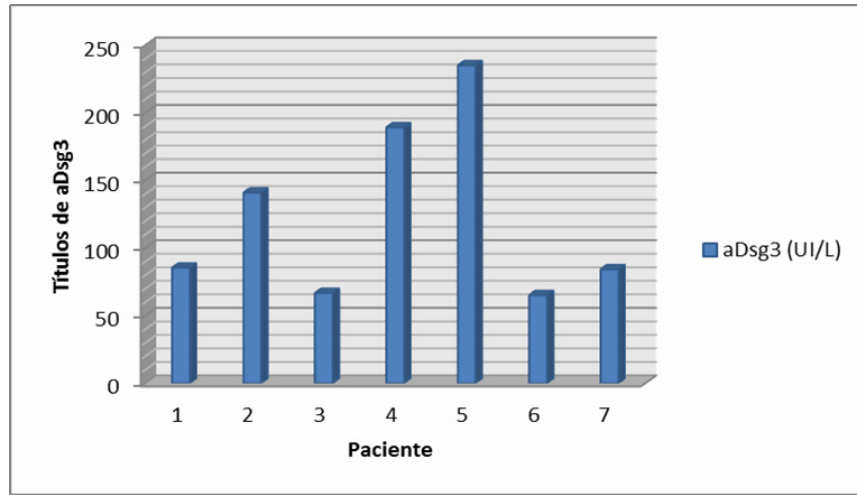


Gráfica 1. Porcentaje de superficie corporal afectada en los pacientes analizados.



aAChr= Anticuerpos anti-receptor de acetilcolina.

Gráfica 2. Títulos de anticuerpos anti-receptor de Acetilcolina en los pacientes analizados.



aDsg3= Anticuerpos antidesmogleína 3.

Gráfica 3. Títulos de anticuerpos anti-desmogleína 3 en los pacientes analizados.

La distribución de la información epidemiológica con respecto al sexo y a la media de edad de los pacientes se presenta en la tabla 2. Además se incluyen los promedios de los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y antidesmogleína 3 que se obtuvieron en los análisis realizados.

Variable	Sujetos (n= 7)
Género (M/F) (%)	3 (43)/ 4 (57)
Edad (años) \pm DE	48 \pm 8.52
Superficie corporal afectada (%)	47.43 \pm 17.29
aAChr (nmol/L) \pm DE	2.75 \pm 1.2
aDsg3 (UI/L) \pm DE	123.85 \pm 66.67

M/F= Masculino/Femenino.

DE= Desviación estándar.

aAChr= Anticuerpos antireceptor de acetilcolina.

aDsg3= Anticuerpos antidesmogleína 3.

Tabla 2. Distribución de los datos por grupo.

Evaluación de los anticuerpos

Se encontró una correlación de 78% para anticuerpos contra receptor de acetilcolina y 85% para anticuerpos antidesmogleína 3, con respecto al porcentaje de superficie corporal afectada, en los pacientes con PV analizados. El 47% ($R^2 = 46.75$) de las variaciones en la superficie corporal afectada se explicarían por los valores de los anticuerpos contra receptor de acetilcolina. (Figura 1).

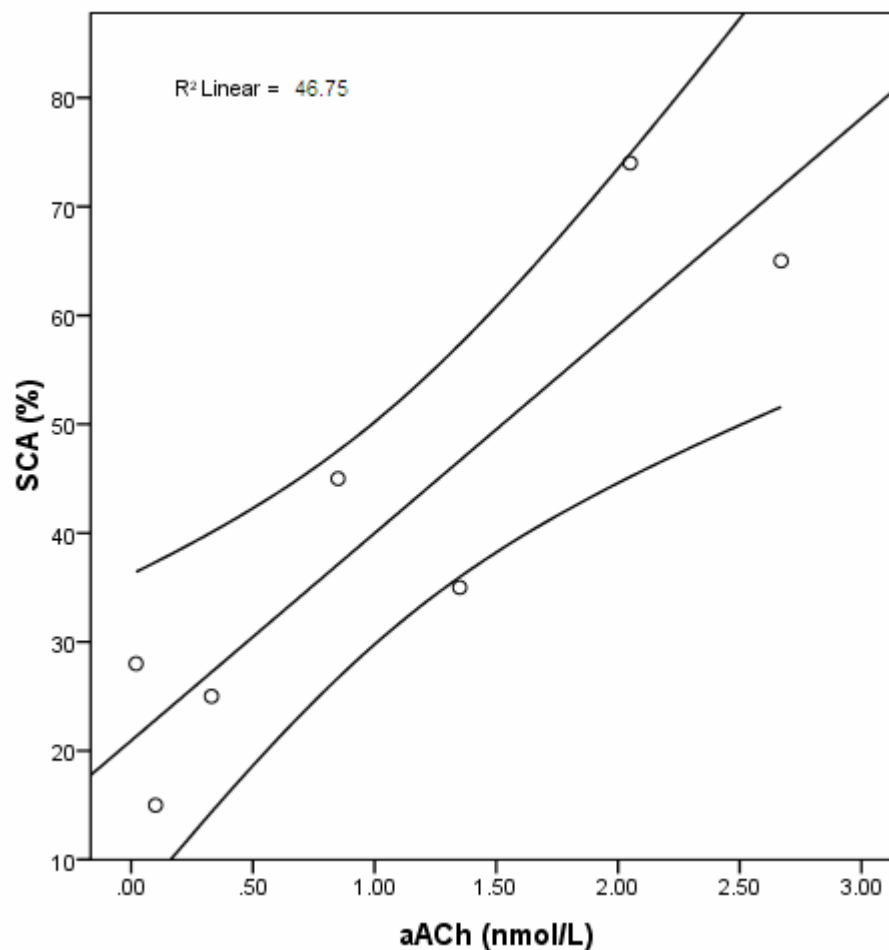


Figura 1. Regresión lineal, Superficie corporal afectada, niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina

Mientras que 59% ($R^2= 59.25$) de las variaciones en la severidad de la enfermedad se explicarían por los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3. (Figura 2).

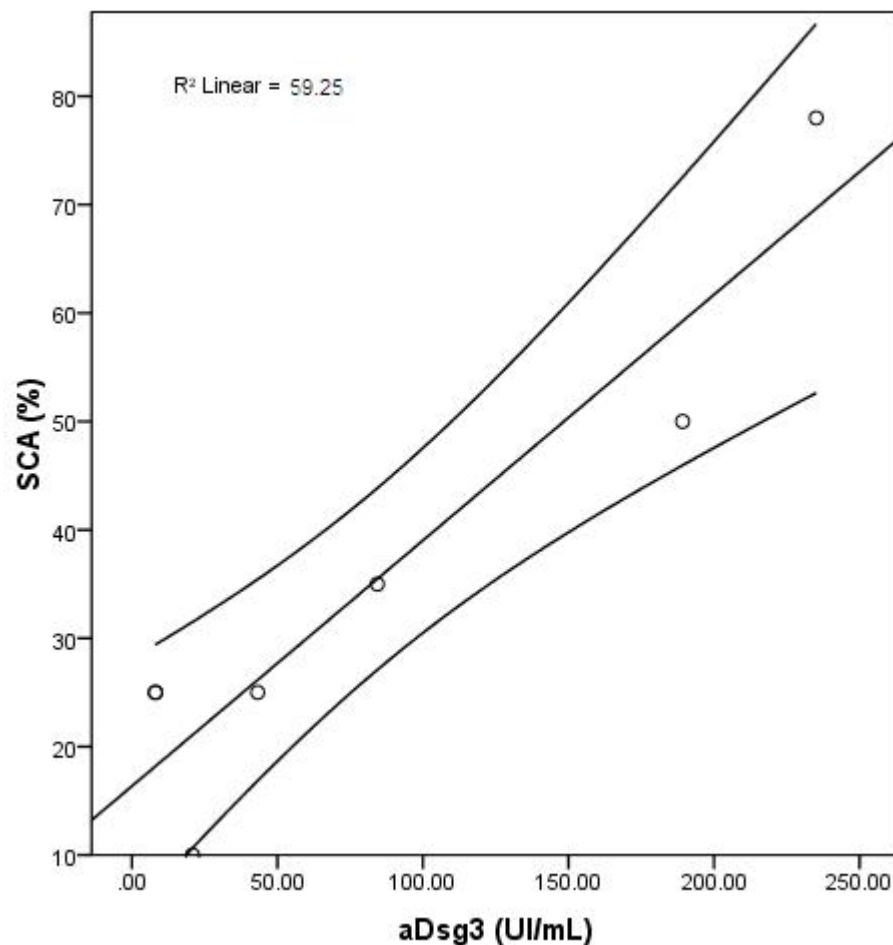


Figura 2. Regresión lineal, Superficie corporal afectada, niveles de anticuerpos anti-desmogleína 3

Se observó una correlación del 80% entre los niveles de ambos anticuerpos; detectándose que el 65% ($R^2= 65.35$) de las variaciones en los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3 se explicarían por los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina. (Figura 3).

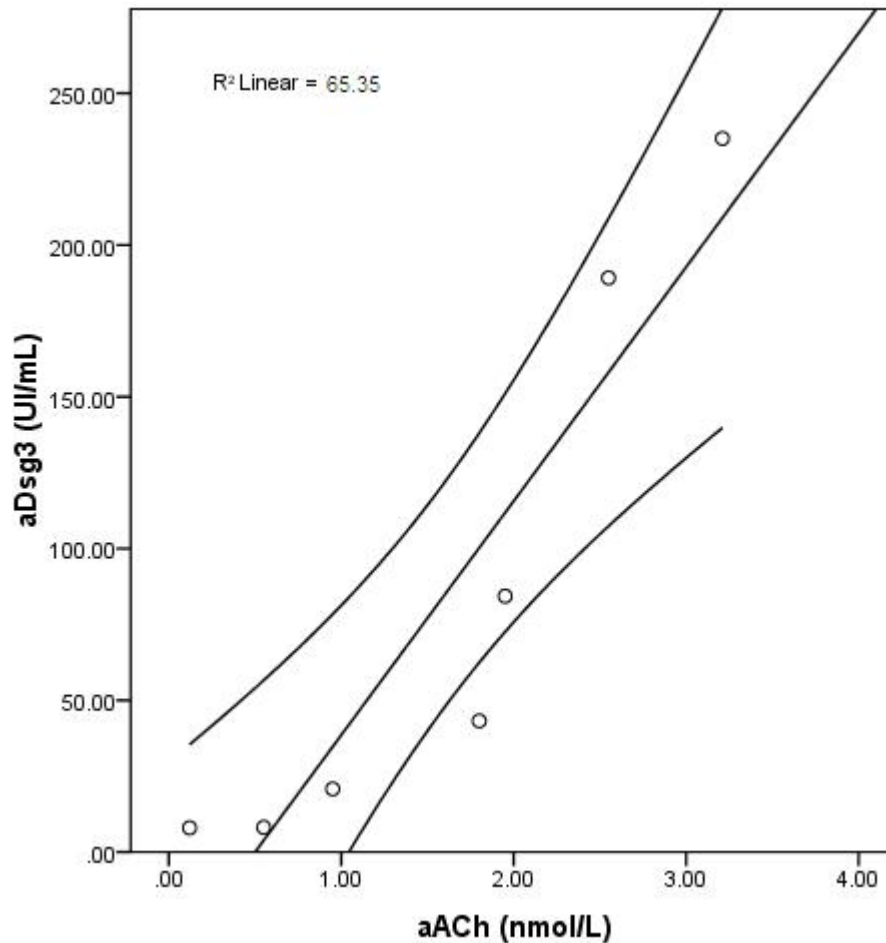
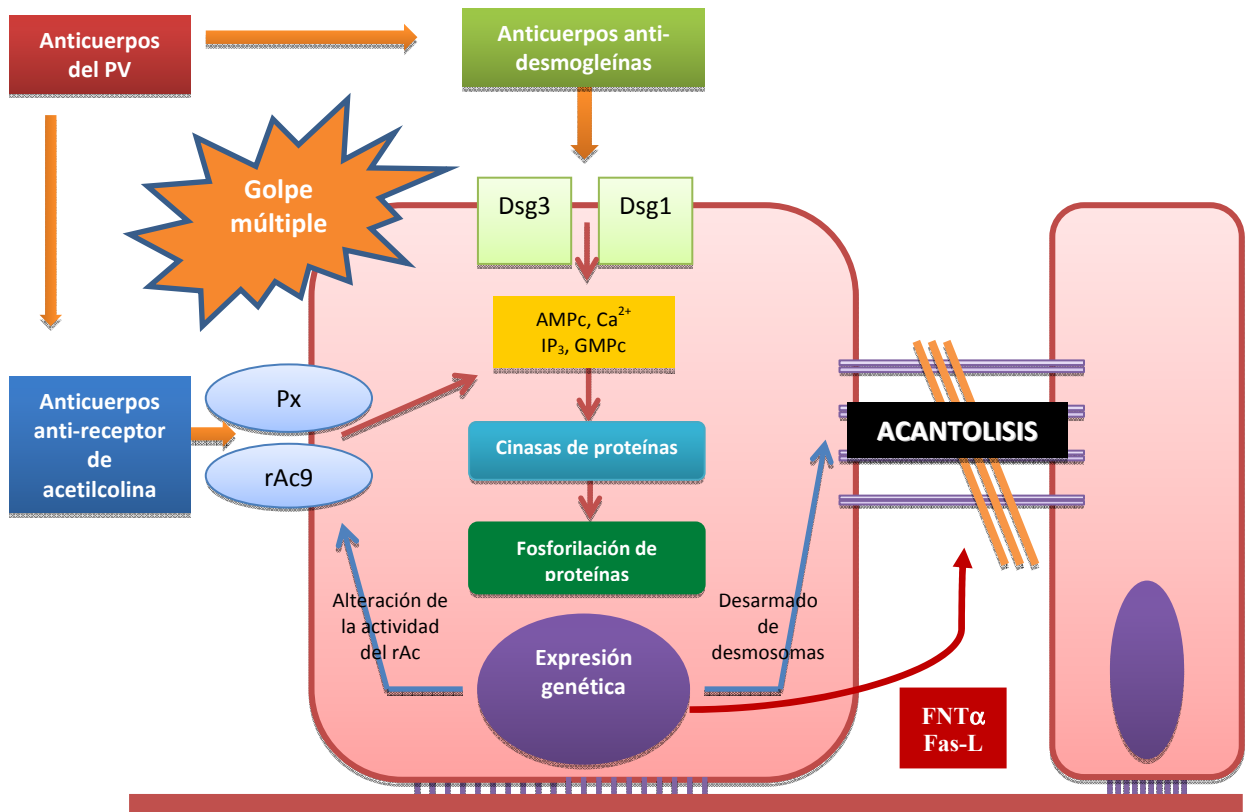


Figura 3. Regresión lineal, Niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y anti-desmogleína 3.

El mecanismo propuesto en el desarrollo del fenómeno autoinmune en el PV se expone en la figura 4. Dentro de la fisiopatología de esta enfermedad se sabe que los anticuerpos antidesmogleínas se unen a estos antígenos en la superficie de los queratinocitos, promoviendo la formación de segundos mensajeros (Calcio, fosfatidilinositol, AMPc, GMPc), la activación de cinasas de proteínas, dando paso a la fosforilación de productos proteicos que tendrán repercusión en la expresión genética de otros mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa y Fas-

ligando. Hasta el 85% de los pacientes con PV presentarán anticuerpos anti-receptor de acetilcolina circulantes, los cuales se unirán a antígenos de la superficie de los queratinocitos, como el receptor de acetilcolina 9 y la pemfaxina. Por medio de esta unión, se producirá una cascada de eventos similar a la que se produce cuando los anticuerpos antidesmogleínas se unen a sus antígenos de membrana específicos.



Px: pemfaxina, aAChR9: receptor de acetilcolina 9, IP3: fosfatidil-inositol 3, FNTα: factor de necrosis tumoral alfa, Fas-L: Fas ligando.

Figura 4. Mecanismo propuesto del proceso autoinmune en el pénfigo vulgar.

11. DISCUSIÓN

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad ampollosa autoinmune, intraepitelial, que afecta la piel y las membranas mucosas y está mediada principalmente por auto anticuerpos dirigidos contra los constituyentes del sistema principal de unión interqueratinocítica: el desmosoma. En el PV se rompe el equilibrio de la respuesta inmunológica, la que tiene por finalidad, de manera esperada, el reconocimiento de agentes externos y el poder montar una respuesta sea de tipo celular, humoral o combinada para preservar la homeostasis del organismo. Se ha visto a través de estudios experimentales que al desestabilizarse este equilibrio, pueden generarse procesos autoinmunes en los que se ve involucrados de manera importante los linfocitos T, dilucidando de tal manera la serie de mecanismos relacionados, los cuales siguen en estudio y aún no se ha determinado con certeza el papel que juega la inmunidad Th1 y Th2, así como la interrelación de las citocinas derivadas de ambas líneas.

Dentro de los procesos involucrados en el desarrollo de la enfermedad solamente se han aclarado algunos de ellos y dentro de estos se sabe que la susceptibilidad genética condiciona una desregulación inmunológica que, aunada a otros procesos multifactoriales, son los responsables del desencadenamiento y mantenimiento de la dermatosis.

En los últimos años se han encontrado algunos antígenos, que representan otras moléculas de adhesión que no pertenecen a las desmogleínas^{23,25,30}. Dentro de estos se encuentran las desmocollinas, desmoplaquinas, colágeno XVII/BP180, anexinas

de receptores de acetilcolina del queratinocito, la penfaxina o molécula similar a la anexina y la cadena alfa del receptor de alta afinidad de la IgE^{4,16,18}. Parece ser que el fenómeno de acantolisis está mediado por una serie de citocinas, como la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral α , la IL-6, la IL-10, aunque esta asociación no es muy clara^{10,17}.

La patogénesis de la acantolisis puede deberse a dos mecanismos diferentes ya comentados anteriormente; el primero, en el cual la explicación fisiopatológica de la pérdida de la unión intercelular de los queratinocitos es la inhibición directa de las funciones de adhesión^{25,29}. En segundo lugar, la alteración del contacto intercelular es debida a procesos más complejos, que son posteriores a la interacción entre los anticuerpos contra el pénfigo vulgar y las desmogleínas, con secreción o activación de proteasas, las cuales son responsables de la acantolisis^{28,30}.

En los últimos años, se le ha dado atención al rol fisiopatológico de los antígenos no-desmogleína, como los receptores de acetilcolina y la penfaxina, pertenecientes al eje colinérgico, en el cual la acetilcolina como sustancia “citotransmisora”, está involucrada en el control de la adhesión queratinocito-queratinocito^{5,13}. Se sabe que la acetilcolina está presente en tejidos no pertenecientes al sistema nervioso y que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo^{15,24}. Los queratinocitos epiteliales humanos son miembros de una red de señalización no-neurológica que tiene influencia en la mediación de la comunicación intercelular en la piel, en la cual la acetilcolina actúa como una hormona local o una citocina^{9,21}. La acetilcolina neuronal es sintetizada, secretada y degradada en los queratinocitos, y tiene una

gran variedad de efectos biológicos en estas células, ya que puede activar simultáneamente diferentes vías de señalización intracelular^{7,16}.

La actividad de la acetilcolina se ha relacionado con diversos eventos bioquímicos, lo cual, en conjunto con otros efectos acumulativos hormonales y estímulos ambientales, determinan complejos cambios a nivel tisular^{18,26}.

Se ha descrito que la acetilcolina es responsable de diversos efectos en la proliferación de queratinocitos, en su migración y diferenciación, además de su influencia en la adhesión intercelular^{4,11}. La activación de los receptores de acetilcolina puede afectar las vías de señalización que regulan la expresión o función de moléculas de adhesión en algunos tipos celulares, además del estado de fosforilación proteica^{15,23}. Se ha mostrado que los receptores de acetilcolina de los queratinocitos pueden regular la adhesión de los desmosomas, alterando la expresión de las desmogleínas 1 y 3, así como el estado de fosforilación de esta última^{2,8}.

La identificación de los receptores de acetilcolina en la superficie celular de los queratinocitos como uno de los blancos de los anticuerpos del PV, además del descubrimiento de la influencia colinérgica en la adhesión intercelular sirve para explicar el efecto terapéutico benéfico que se ha visto en algunos casos reportados con medicamentos colinomiméticos, como la pilocarpina, el bromuro de piridostigmina y la nicotinamida^{25,29,40,42}.

Se ha reportado que aproximadamente el 85% de los pacientes con pénfigo desarrollan anticuerpos contra los receptores de acetilcolina de los queratinocitos, los cuales se han identificado como el receptor de acetilcolina 9, un homopentámero que regular la adhesión en células epiteliales y una anexina de 75kDa llamada penfaxina o anexina 31, que actúa como un receptor de acetilcolina^{4,13}.

Estos hallazgos sugieren que la acetilcolina y sus receptores pueden estar involucrados en el desarrollo de acantolisis, generando una nueva perspectiva de la enfermedad, así como abre la posibilidad de nuevos blancos terapéuticos.

En nuestro trabajo encontramos que los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina se correlacionaron en un 78% con el porcentaje de la superficie corporal afectada, mientras que los anticuerpos antidesmogleína 3 lo hicieron en un 85%, con una asociación ligeramente más importante. En lo que respecta a las variaciones de la superficie corporal afectada en base a los valores de los anticuerpos, también se encontró que los anticuerpos antidesmogleína 3 explican hasta en un 59% ($R^2=59.25$) estos cambios en la clínica, mientras que los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina lo harían en un porcentaje menor, de alrededor del 47% ($R^2=46.75$). Estos nos lleva a concluir que aunque está presente la correlación de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina con el porcentaje de superficie corporal afectada de forma importante, ésta relación es menor a la que presentan los anticuerpos anti-desmogleína 3 con esta variable; además de que el porcentaje de variación de la superficie corporal afectada también se explicaría en mayor porcentaje por estos últimos anticuerpos en comparación con los anti-receptor de acetilcolina.

En lo que respecta a la asociación entre ambos anticuerpos, los resultados mostraron que estos se correlacionaron en un 80%; siendo éste un porcentaje importante, además de que se detectó que el 65% ($R^2= 65.35$) de las variaciones en los niveles de anticuerpos antidesmogleína 3 se explicarían por los anticuerpos anti receptor de acetilcolina. Con esto nos podemos dar cuenta que su asociación al momento de una medición transversal es muy buena, mientras que las variaciones en el tiempo de los anticuerpos antidesmogleína 3 con respecto a los anti-receptor de acetilcolina presenta una buena correlación, esto pudiendo relacionarse a las teorías del golpe múltiple (*multiple hit*) dentro de la fisiopatología del pénfigo vulgar, en las cuales se nombra que los anticuerpos antidesmogleína 3 no son los únicos presentes dentro del proceso autoinmune, sino que deben de haber varios mecanismos patogénicos que en conjunto dan como resultado el proceso de acantolisis y como manifestación final, el cuadro clínico del PV que conocemos.

12. CONCLUSIONES

El Pénfigo Vulgar (PV) es una patología crónica, grave, de etiología autoinmune, que forma parte de las enfermedades ampollasas de la piel y las mucosas. Su presentación puede variar en el grado de severidad llegando a provocar en algunos casos la muerte. En los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones con la finalidad de tener un mayor conocimiento de la fisiopatología de este proceso de acantolisis y poder detectar los antígenos que están involucrados en su presentación. En tiempos recientes, se le ha dado atención al rol fisiopatológico de los antígenos no-desmogleína, como los receptores de acetilcolina y la pemfaxina,

pertenecientes al eje colinérgico, en el cual la acetilcolina como sustancia “citotransmisora”, está involucrada en el control de la adhesión queratinocito-queratinocito. Se ha encontrado que la acetilcolina juega un papel importante en la fisiología del queratinocito y en la adhesión entre estas células epidérmicas. En algunos trabajos de investigación se ha reportado que hasta 85% de los pacientes con PV desarrollan anticuerpos contra el receptor de acetilcolina. Además, se ha encontrado que el uso de colinomiméticos ha tenido efectos terapéuticos beneficiosos en algunos reportes de casos de pacientes con PV.

El propósito de este trabajo fue tratar de identificar si la presencia de estos anticuerpos en los pacientes con PV tiene relación con la severidad clínica de los mismos, además de tratar de correlacionar los niveles de éstos con los de anticuerpos anti-desmogleína 3. En base a los resultados obtenidos, podemos nombrar las siguientes conclusiones:

1. Los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina presentan una buena correlación (78%) con el porcentaje de superficie corporal afectada utilizada como parámetro de severidad clínica en los pacientes con PV.
2. Con lo nombrado anteriormente, podemos decir que la medición de los títulos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina puede ser de utilidad al momento de la valoración diagnóstica de los pacientes con PV, como un dato objetivo dentro de los estudios de extensión que se realizan en el abordaje inicial.

3. Las variaciones de la superficie corporal afectada en los pacientes con PV se explican en un porcentaje limitado (47%) por los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina según los análisis realizados con los resultados obtenidos.
4. El punto anterior nos lleva a concluir que la utilidad de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina como marcador de la severidad clínica en el seguimiento de los pacientes con PV sería poco relevante.
5. La correlación de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina con los antidesmogleína 3 fue muy importante, con un porcentaje de 80%. Esto se puede relacionar con la teoría del golpe múltiple dentro de la fisiopatología del PV, en la cual no solo los anticuerpos antidesmogleína 3 son los que están presentes para que se presente la dermatosis, sino que existen diferentes tipos de mecanismo de acción para que se desarrolle el proceso de la autoinmunidad.
6. En cuanto a la predicción de la variación de los anticuerpos antidesmogleína 3 con respecto a los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, se obtuvo un porcentaje relevante de 65%, dejando un 35% sin asociación. Esto nos puede llevar a pensar que los diferentes tipos de anticuerpos tienen diferentes fases o etapas dentro de la fisiopatología del PV y que tal vez alguno de ellos tenga que manifestarse en algún tiempo determinado para que la acción del otro sea plena.

Al final, podemos concluir que este estudio constituye la base para proyectos futuros a mayor escala y con seguimiento de los niveles de estos anticuerpos en diferentes etapas y así tratar de correlacionarlos con la severidad clínica basándonos en el porcentaje de superficie corporal afectada que presentarían los pacientes en cada visita de valoración. Esto nos permitiría saber más objetivamente si los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina podrían ser utilizados como marcadores de severidad dentro de la evaluación de seguimiento de los pacientes con PV.

PARTE III. A N E X O S



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.



Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

Investigadores:

Dr. Andrés Tirado Sánchez. Servicio de Dermatología, Hospital General de México.

Dra. Rosa María Ponce Olivera. Servicio de Dermatología, Hospital General de México.

Dr. Héctor Eduardo López Lozano, Residente del Servicio de Dermatología del Hospital General de México

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

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

2. Apartados

I. El médico del estudio invita al paciente a participar en un trabajo de investigación debido a que padece una enfermedad llamada Pénfigo Vulgar, que es una enfermedad ampollosa de la piel y las mucosas. En este estudio se evaluará un nuevo estudio de laboratorio que servirá para determinar la severidad de la enfermedad que usted tiene. Para llevar a cabo esto se necesitará una muestra de sangre de 10mL que se procesará sin costo alguno y al analizarse se comparará con pacientes que no tengan la enfermedad.



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.



Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

II. Si participa en este estudio, requeriremos que acuda 1 vez a la toma de muestra de sangre. La toma de muestra de sangre de 10mL es el único procedimiento invasivo que se realizará y que implicará una pequeña molestia transitoria (dolor leve) en el sitio de la punción. El objetivo de esta toma de muestra es tener la cantidad en sangre de la sustancia que se está analizando y que se comparará con mediciones en sangre que haremos en pacientes sin la enfermedad, todo esto para ver si tiene utilidad para que conozcamos la severidad de su padecimiento.

III. Además del tiempo que invierte en la consulta, usted puede tener alguna de las siguientes molestias:

- La inyección en la vena del brazo para obtener la muestra de sangre de 10mL puede molestias en el sitio de la inyección como dolor leve a moderado, por poco tiempo, que no le impedirá hacer sus actividades normales ni le dejará secuelas en otras partes de su cuerpo. Debido a que la muestra de sangre se tomará con todas las medidas de higiene, prácticamente evitamos cualquier tipo de contaminación en el sitio de la inyección, que si se presentara sería solo enrojecimiento e hinchazón en el sitio de la inyección, con un poco de dolor, que se elimina con el uso de medicamentos que serían proporcionadas por el investigador en caso de presentarse lo anterior en el sitio de la inyección, y que se presente dentro de las dos semanas después de que se tomó la muestra de sangre.



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.



Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

IV. Es posible que este nuevo estudio de laboratorio nos permita determinar con exactitud la gravedad de la enfermedad que estamos estudiando, con lo que podríamos dar un tratamiento oportuno y con menos complicaciones. Sin embargo, es importante que conozca que este estudio no es del tipo infalible y puede darnos resultados no útiles y que no reflejen lo que en realidad está pasando en su organismo. Su participación en el estudio podría no beneficiarlo, pero si podría ayudar a otras personas que tienen la misma enfermedad que usted, todo esto, gracias a la información que obtengamos.

V. Gracias a la información que se obtenga se podría crear un estudio de laboratorio que nos permitiría detectar con mayor exactitud la gravedad de la enfermedad que padece, con lo que no se requeriría tanto tiempo de hospitalización y la calidad de su vida sería mejor ya que podríamos saber con rapidez si su enfermedad tiene posibilidades de hacerse más grave o no.

VI. El médico del estudio está para servirle y para contestarle cualquier pregunta que pueda tener acerca del estudio de laboratorio que ya le mencionamos o de otra cosa del mismo estudio.

VII. Usted como paciente no renuncia a ninguno de sus derechos legales por el hecho de firmar esta carta de consentimiento. Su firma como paciente indica que ha leído y comprendido la información de esta carta. Además, al firmarla usted reconoce que se le ha explicado el estudio y que ha podido hacer preguntas sobre todo lo que no entendía bien, y que éstas han sido respondidas



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.



Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

satisfactoriamente. Asimismo, usted comprende que su participación en el estudio es totalmente voluntaria (no es obligado). El no desear participar en el estudio no le traerá ningún problema, nadie se enojará con usted como paciente o con sus familiares y su decisión no tiene nada que ver en la atención médica a la que el paciente tenga derecho en esta institución de salud.

VIII. El paciente tiene derecho a que nadie sepa que participó en el estudio y toda la información que tengamos en éste permanecerán confidencial, dentro de los límites que marque la ley. Es posible que los resultados del estudio, se publiquen en una revista seria, por lo que usted mediante la firma de este documento lo autoriza, siempre y cuando se mantenga secreta u oculta su identidad.

IX. El paciente y la persona que sea el responsable legal tendrán derecho a conocer los resultados del estudio de laboratorio practicado, también a que se les explique lo que significa dicho resultado.

X y XI. Ni al paciente ni a los familiares se les hará un cobro económico por el marcador de laboratorio ni por la (s) consulta (s) relacionadas con el estudio. El marcador de laboratorio será gratuito sólo durante el estudio.

La atención de problemas de salud que no se relacionen con este estudio seguirá siendo responsabilidad del paciente, como lo hace habitualmente. Ni el paciente ni los familiares recibirán compensación económica por la participación del paciente en el estudio.



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.



Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

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

XII y XIII.

Nombre o huella digital del paciente _____ Fecha _____

Familiar o Responsable legal _____ Fecha _____

Testigo 1 (Nombre y Dirección) _____

Fecha _____ Relación con el paciente _____

Testigo 2 (Nombre y Dirección) _____ Fecha _____

_____ Relación con el paciente _____

XIV. Si en algún momento tiene cualquier pregunta relacionada con este estudio o experimenta una lesión relacionada con la investigación, por favor contacte de inmediato a la Dra. Rosa María Ponce Olivera, al conmutador 2780-2000 ext. 1055 (lunes a viernes de 8 a 16hrs), al Dr. Héctor López



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.



Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

Autorización para participar en el estudio de investigación titulado:

“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”

Lozano al 2780-2000 ext. 1052 (lunes a viernes de 8 a 16hrs) o al Dr. Andrés Tirado Sánchez al cel. 5527-44-2811 (24hrs).

Si tiene cualquier pregunta respecto a sus derechos como paciente de investigación, se puede comunicar con la Dra. Hilda Hidalgo Loperena, Presidente de la Comisión de Ética del Hospital General de México, en la calle Dr. Balmis 148, Col. Doctores, México, D.F. al teléfono 2789-2000 extensión 1368.

XV. En caso de requerir atención médica acudir al Servicio de Dermatología del Hospital General de México de lunes a viernes de 8 a 16hrs o al Servicio de Urgencias del mismo Hospital disponible las 24hrs. Usted puede decidir no participar en el estudio, o, si decide participar en el estudio, se puede retirar del mismo en cualquier momento. Su decisión de no participar o de retirarse del estudio, no significará ningún castigo o pérdida de beneficios a los cuales tenga derecho, y no evitará su acceso a la atención médica. Si decide retirarse, por favor notifique al Dr. Andrés Tirado Sánchez por escrito y hágale saber que se está retirando del estudio.

Si el paciente o los familiares creen que existe algún problema relacionado con este estudio, por favor contacte (n) de inmediato al Dr. Héctor López al conmutador 2780-2000 ext. 1052 (lunes a viernes de 8 a 16hrs) o a la Dra. Rosa María Ponce al conmutador 2780-2000 ext. 1055 (lunes a viernes de 8 a 16hrs), al Dr. Andrés Tirado al cel. 5527-44-2811 (24hrs) o a la Dra. Hilda Hidalgo, presidenta de la Comisión de Ética al 2789-2000 ext. 136.

Anexo 2. Hoja de Recolección de Datos.

Proyecto de Investigación:

**“ASOCIACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA
CON LA SEVERIDAD CLÍNICA Y CON LOS ANTICUERPOS
ANTIDESMOGLEÍNA 3 EN PACIENTES CON PÉNFIGO VULGAR DEL
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”**

México, D.F. a ____ de _____ del 2011.

Nombre _____

Número de expediente _____

Edad _____

Sexo _____

Pénfigo vulgar: Si _____ No _____

Superficie corporal afectada (%) _____ Fecha.- _____

Concentración plasmática de aAChR (mmol/L) _____ Fecha.- _____

Concentración plasmática de aDsg3 (UI/L) _____ Fecha.- _____

Anexo 3. Procedimiento para la recolección de la muestra.

Objetivo.- Detallar los pasos a seguir para una correcta recolección de muestra sanguínea para la determinación de las concentraciones plasmáticas de Anticuerpo anti-receptor de acetilcolina (aAChR).

Alcances.- Pacientes con carta de consentimiento informado.

Responsable.- Dr. Andrés Tirado Sánchez.

Referencias.- Instrucciones insertas en el estuche comercial _____.

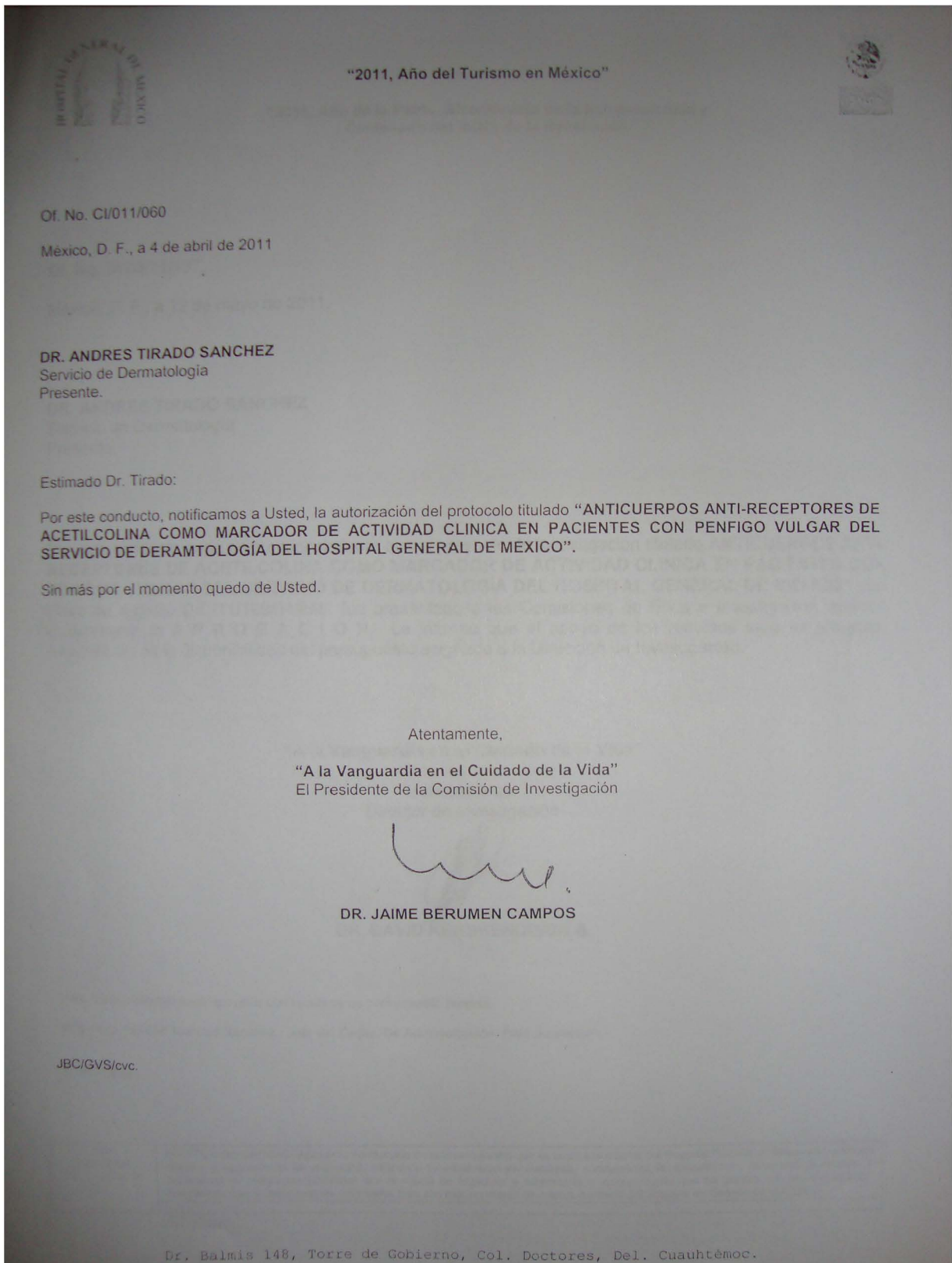
Equipamiento y materiales.- Tubos Vacutainer con anticoagulante EDTA (tapón morado), alcohol, torundas de algodón estéril, aguja para Vacutainer #21, adaptador de aguja (camisilla de plástico), ligadura, guantes de látex #7 estériles desechables, contenedor sólido para material punzocortante (caja roja con tapa blanca), contenedor de bolsa (roja con plástico grueso).

Desarrollo.-

1. La persona responsable de la toma de la muestra debe portar una identificación visible.
2. Se preguntará al paciente su nombre y apellidos completos
3. Se identificará el tubo con la información del paciente, el número del expediente y la fecha.
4. Preparar todo el material necesario
5. Sentar al paciente, colocar el brazo del paciente en la paleta de la silla para la toma de la muestra.
6. Se realizará asepsia al tapón del tubo
7. Se colocará la aguja y el tubo al adaptador del Vacutainer
8. Se seleccionará una vena periférica adecuada (extremidad superior derecha preferentemente)

9. Se limpiará el área a puncionar con una torunda con alcohol, primero en la zona de punción y posteriormente en círculos excéntricos, esperando a que se seque y no se volverá a tocar sin guantes.
10. Se aplicará el torniquete (no más de 1 minuto).
11. Se colocarán los guantes y se avisará al paciente de la punción
12. Se Puncionará en ángulo de 45° con respecto al eje de la piel, con el bisel de la aguja hacia arriba.
13. Se extraerán 10mL de sangre
14. Se liberará el torniquete cuando la sangre comience a fluir.
15. Se colocará un nuevo algodón sobre el sitio de la punción y se ejercerá una presión suave por 1 a 3 minutos o hasta que no se observen rastros de sangrado.
16. Se desechará la aguja y los guantes en los recipientes correspondientes.
17. Se llevará el tubo inmediatamente a centrifugar
18. Se pipeteará el sobrenadante (plasma) y se colocará en un criotubo previamente rotulado como en el tubo original de la muestra.
19. Posteriormente se mantendrá en congelación a -20 o -30° C hasta su procesamiento.

Anexo 4. Hojas de autorización del proyecto de investigación.





"2010, Año de la Patria. Bicentenario de la Independencia y
Centenario del Inicio de la Revolución"



Of. No. DI/03/11/127.

México, D. F., a 12 de mayo de 2011.

DR. ANDRES TIRADO SANCHEZ
Servicio de Dermatología
Presente.

Por este conducto hago de su conocimiento que el proyecto de investigación titulado **ANTICUERPOS ANTI-RECEPTORES DE ACETILCOLINA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD CLINICA EN PACIENTES CON PENFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**", con clave de registro DIC/11/109/04/045, fue presentado a las Comisiones de Ética e Investigación quienes dictaminaron la **A P R O B A C I O N**. Le informo que el apoyo de los recursos para su proyecto, dependerán de la disponibilidad del presupuesto asignado a la Dirección de Investigación.

"A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida"

Atentamente
Director de Investigación

DR. DAVID KERSHENOBICH S.

Nota: Este protocolo será apoyado con recursos de presupuesto federal.

c.c.p.- Lic. Félix M. Morales Sánchez.- Jefe del Depto. De Administración. Para su atención.

DKS/YRT/cvc.

ISO
9001:2000
ECMX-0333/06

POLITICA DE CALIDAD: Apoyar la conducción de la investigación que se realiza al interior del Hospital General de México a través del registro y seguimiento de proyectos, utilizando la infraestructura instalada, conduciendo la capacitación, así como la difusión y publicación de resultados obtenidos con el objeto de organizar y administrar el conocimiento que se genera con la investigación; cumpliendo con el requerimiento del cliente; todo ello bajo un marco de mejora continua del Sistema de Gestión de la Calidad.



"2011, Año del Turismo en México"



Of. No. CE/011/418

México, D. F., a 9 de mayo de 2011.

DR. ANDRES TIRADO SANCHEZ
Servicio de Dermatología
Presente.

Estimado Dr. Tirado:

Notificamos a usted, la autorización del protocolo titulado "ANTICUERPOS ANTI-RECEPTORES DE ACETILCOLINA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD CLINICA EN PACIENTES CON PENFIGO VULGAR DEL SERVICIO DE DERMATOLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO".

La última versión, ha sido aprobada por la Comisión de Ética de este Hospital el día 3 de mayo del presente, para su realización a cargo de Usted en el Servicio de Dermatología.

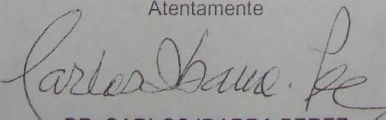
Asimismo el Consentimiento Informado ha sido aprobado para ser utilizado en este ensayo.

Toda vez que el protocolo original y/o el Consentimiento informado sufran modificaciones, éstas deberán someterse a esta Comisión para su re-aprobación.

Agradeciendo a usted renovar la autorización de su ensayo al año de emitido este oficio, debiendo presentar anexo a su solicitud, un resumen del desarrollo de la investigación a su cargo.

"A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida"

Atentamente



DR. CARLOS IBARRA PEREZ
Presidente de la Comisión de Ética

CIP/EGE/cvc

Dr. Balmis 148, Unidad 301 2°. Piso, Col. Doctores, Del. Cuauhtemoc.
México, DF 06726

PARTE IV. REFERENCIAS

1. Korman N. Pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1988;18:1219-38.
2. Scott JE, Ahmed AR. The blistering diseases. *Med Clin North Am* 1998;82:1239-83.
3. Nousari HC, Anhalt GJ. Pemphigus and bullous pemphigoid. *Lancet* 1999;354:667-72.
4. Beutner EH, Jordan RE. Demonstration of skin antibodies in sera of Pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;117:505-10
5. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology, *J Am Acad Dermatol* 2001; 45(6): 803-22; quiz 822-4
6. Sánchez-Pérez J, García-Diez A. Pemphigus. *Actas Dermosifiliogr* 2005;96:329-56.
7. Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Esmaili N, Balighi K, Hallaji Z, et al. Pemphigus: analysis of 1209 cases. *Int J Dermatol* 2005;44:470-6.
8. Uzu S, Durdu M. The specificity and sensitivity of Nikolskiy sign in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3): 411-5.
9. Goldsmith LA. Pemphigus: pathogenesis, pharmacology and progress: a meeting report of pemphigus 2005--progress and future directions, held June 16-17, 2005 in Bethesda, Maryland (USA). *J Invest Dermatol* 2005;125:vii-viii.
10. Sitaru C, Zillikens D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol* 2005;14:861-75.

11. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(2): 244-52
12. Jamora MJ. Antibodies to Desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(6): 976-7
13. López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Treatment of pemphigus and pemphigoids. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10:410-1.
14. Mutasim DF, Bilic M, Hawayek LH, Pipitone MA, Sluzevich JC. Immunobullous diseases. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(6): 1029-43
15. Bystryń JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet* 2005; 366: 61.
16. Wolff K, Schreiner E. Ultrastructural localization of pemphigus autoantibodies within the epidermis. *Nature* 1971; 229: 59.
17. Patel HP, Diaz LA, Anhalt GJ, Labib RS, Takahashi Y. Demonstration of pemphigus antibodies on the cell surface of murine epidermal cell monolayers and their internalization. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 409.
18. Shimizu A, Ishiko A, Ota T, et al. Ultrastructural changes in mice actively producing antibodies to desmoglein 3 parallel those in patients with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 318.
19. Mascaro JM, Espana A, Liu Z, et al. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 90.
20. Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 2000; 157: 1377.

21. Bastian BC, Nuss B, Romisch J, Kraus M, Brocker EB. Autoantibodies to annexins: a diagnostic marker for cutaneous disorders? *J Dermatol Sci* 1994; 8: 194.
22. Nguyen VA, Ndoye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin, a novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 2000; 275: 29466.
23. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 684.
24. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Grando SA. Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. *Life Sci* 2003; 72: 2081.
25. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 41.
26. Ndoye A, Buchli R, Greenberg B, et al. Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998; 111.
27. Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic receptor signalling in nonexcitable cells. *J Neurobiol* 2002; 53: 524.
28. Grando SA, Kawashima K, Wessler I. The non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 2003; 72: 2009.
29. Kurzen H, Berger H, Jager C, et al. Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 937.
30. Kurzen H, Schallreuter KU. Novel aspects in cutaneous biology of acetylcholine synthesis and acetylcholine receptors. *Exp Dermatol* 2004; 13: 27.

31. Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, Dahl MV. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 412.
32. Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA. Receptormediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 973.
33. Williams CL, Hayes VY, Hummel AM, Tarara JE, Halsey TJ. Regulation of E cadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma. *J Cell Biol* 1993; 121: 643.
34. Conroy WG, Ogden LF, Berg DK. Cluster formation of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors at interneuronal interfaces in cell culture. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2699.
35. Nakayama H, Numakawa T, Ikeuchi H, Hatanaka H. Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signalregulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *J Neurochem* 2001; 79: 489.
36. Dajas-Bailator FA, Soliakov L, Wonnacott S. Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurones. *J Neurochem* 2002; 80: 520.
37. Nguyen VT, Lee TX, Ndoye A, et al. The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. *Arch Dermatol* 1998; 134: 971.

38. Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* 2000; 106: 1467.
39. Grando SA, Dahl MV. Activation of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors reverses pemphigus acantholysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1993; 2: 72.
40. Grando SA. Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* 2000; 201: 290.
41. Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Pittelkow MR, Kitajima Y, Grando SA. Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists. *Arch Dermatol* 2004; 140: 327.
42. Grando SA. New approaches to the treatment of pemphigus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004; 9: 84.
43. Szonyi M, Csermely P, Sziklai I. Acetylcholine-induced phosphorylation in isolated outer hair cells. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 185.
44. Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, et al. Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Exp Cell Res* 2004; 294: 534.
45. Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 2000; 100: 209.