



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGÍA Y SIFILOGRAFIA
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS

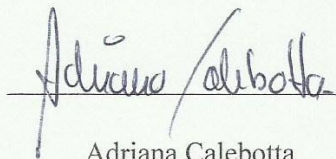
CÉLULAS NK EN ENFERMEDADES AMPOLLARES AUTOINMUNES

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al título de Especialista en
Dermatología y Sifilografía

Tutor: Adriana Calebotta
Co-tutor: Jenny Garmendia

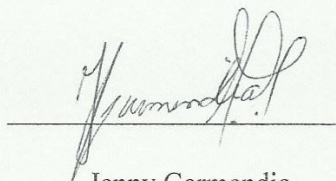
María Carolina Hernández Figuera
Perla Luiguimar Meneses Rodríguez

Caracas, febrero de 2017



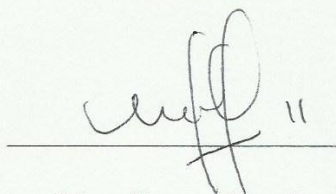
Adriana Calebotta

Tutor



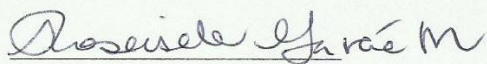
Jenny Garmendia

Co-Tutor



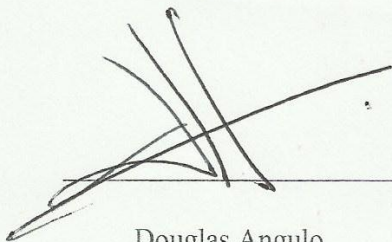
Mary Carmen Ferreiro

Director del curso



Roseisela García

Coordinador del curso



Douglas Angulo

Asesor

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MÉTODOS	15
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	20
AGRADECIMIENTOS	23
REFERENCIAS	24
ANEXOS	28

CÉLULAS NK EN ENFERMEDADES AMPOLLARES AUTOINMUNES

María Carolina Hernández Figuera, C.I. 17.039.486. Sexo: Femenino, E-mail: machy_rola@hotmail.com. Telf: 0414-8639771. Dirección: Hospital Universitario de Caracas.

Especialización en Dermatología y Sifilografía

Perla Luiguimar Meneses Rodríguez, C.I. 17.166.970. Sexo: Femenino, E-mail: perla970@hotmail.com. Telf: 0424-2705660. Dirección: Hospital Universitario de Caracas.

Especialización en Dermatología y Sifilografía

Tutor: **Adriana Calebotta De Medina**, C.I. 5.305.906. Sexo: Femenino, E-mail: adrianacalebotta84@gmail.com. Telf: 0412-7382847. Dirección: Hospital Universitario de

Caracas. Especialización en Dermatología y Sifilografía.

Co-tutor: **Jenny Garmendia Pomares**, C.I. 6.925.483. Sexo: Femenino, E-mail: jenny.garmendia@gmail.com. Telf: 0416-6305546/0212-9777744. Dirección: Instituto de

Inmunología. Universidad Central de Venezuela

RESUMEN

Las células Natural Killer (NK) proporcionan al organismo defensa contra microorganismos y células tumorales activando una maquinaria citolítica. Estudios recientes han demostrado el papel de las células NK en patologías autoinmunes. Se presenta un estudio sobre el rol de las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes. Objetivo: Determinar valores de células NK en sangre periférica de pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en actividad que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas con controles sanos. Metodología: Estudio de cohorte observacional, prospectivo. La muestra fue de 18 pacientes. Se aplicó estadística descriptiva. Resultados: No hubo diferencias entre valores de células NK entre pacientes y controles. Al comparar pacientes sin uso de corticoesteroides se obtuvieron valores de células NK más altos en relación a los controles sanos y disminución de sus niveles al ser tratados con corticoesteroides. Se determinaron niveles de células NK dim más altos en pacientes que no recibían tratamiento y sus niveles disminuyeron con el uso de corticoesteroides. No hubo diferencias en valores de linfocitos CD3+. Células NKT obtuvieron niveles más altos en los pacientes. Conclusiones: Las células NK y su subtipo NK dim se encuentran aumentadas en los pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en

actividad que no reciben tratamiento con corticoesteroides sistémicos y el uso de estos fármacos modifica sus valores en sangre periférica.

PALABRAS CLAVE: Enfermedades ampollares autoinmunes, células Natural Killer, corticoesteroides.

NK CELLS IN AUTOIMMUNE BLISTERING DISEASES

ABSTRACT

The NK cells provide defense to the organism against microorganisms and tumor cells activating a cytolytic machinery. Recent studies have demonstrated the role of NK cells in autoimmune diseases. Objective: To determine NK cell levels in peripheral blood of patients with active autoimmune blistering diseases who came to Dermatology Service of Caracas University Hospital and healthy controls. Methodology: Observational, prospective cohort study. The sample was 18 patients. Descriptive statistics were applied. Results: There were no differences between patients NK levels and controls. When comparing patients without corticosteroids they had higher NK levels in relation to the controls and decrease of the levels when they being treated with corticosteroids. Higher levels of NK dim were determined in untreated patients and their levels decreased with the use of corticosteroids. There were no differences in CD3 + levels. NKT levels were higher in patients. Conclusions: NK cells and NK dim subtype are incremented in patients with autoimmune blistering diseases that are not treated with systemic corticosteroids and the use of these drugs modifies their levels in peripheral blood.

KEY WORDS: Autoimmune blistering diseases, Natural Killer cells, corticosteroids.

INTRODUCCIÓN

Las células citotóxicas naturales (Natural Killer- NK) son uno de los principales componentes del sistema inmune innato. Estas proporcionan al organismo una gran defensa contra microorganismos y células tumorales ⁽¹⁾. Estas células secretan citocinas, quimiocinas y activan una maquinaria citolítica dependiente de un amplio grupo de receptores de superficie que interactúan con determinados ligandos con funciones activadoras e inhibitorias. Además las células NK participan en la actividad del sistema inmune adaptativo a través de células T y células dendríticas mediante la identificación de ciertos receptores ⁽²⁾.

Estudios recientes han determinado la importancia de las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes como el pénfigo vulgar, demostrándose un incremento de las mismas en fases activas de esta enfermedad y contribuyendo en la respuesta inmune Th1, mediante la secreción de INF- γ , permitiendo validar la importancia de este grupo de células en la patogénesis de enfermedades ampollares autoinmunes ⁽³⁾.

Es por esto que, un estudio que relacione las enfermedades ampollares autoinmunes con las células NK es importante para ampliar los conocimientos de la fisiopatología de estas entidades pudiendo contribuir en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

Planteamiento y delimitación del problema

Con base a lo anteriormente expuesto, las autoras del presente Trabajo Especial de Grado desarrollaron un estudio que permitió analizar el rol de las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes. En consecuencia, se formuló la siguiente interrogante que por razones metodológicas se presentó como problema objeto de investigación. ¿Existen niveles alterados de células NK en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas en el periodo comprendido entre febrero 2016- agosto 2016?

Justificación e importancia

La patogénesis de las enfermedades ampollares autoinmunes aún no se ha descifrado completamente. La participación de las células NK en este grupo de enfermedades constituye un avance para el conocimiento de su patogenia, permitiendo en el futuro, la identificación celular y molecular que preceden a la producción e inducción de auto anticuerpos que caracteriza a este grupo de enfermedades ⁽³⁾.

Se justificó el presente Trabajo Especial de Grado ya que no hay investigaciones publicadas en la literatura venezolana y pocas en la literatura internacional, que reporten el rol de las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.

Por otra parte, se resalta la importancia del estudio como aporte científico para futuras investigaciones en este centro de salud o como antecedente para otros trabajos en instituciones universitarias.

Antecedentes

Se ha demostrado que las células NK desempeñan un rol relevante en enfermedades de la piel ⁽⁴⁾. En la psoriasis, estudios en leucocitos de sangre periférica y en tejido lesional indican que existe un número elevado de células NK, IFN- γ y TNF- α ⁽⁵⁾.

Sólo se encontraron dos estudios en la literatura que han reportado el papel de las células NK en pénfigo vulgar ^(3,6). Uno de los estudios realizados, permitió demostrar que la interacción de CD56+ CD3- y los linfocitos T CD4+ produce un perfil de citocinas y quimiocinas que pueden explicar parcialmente la inflamación observada en los tejidos enfermos y la producción de auto-anticuerpos específicos ⁽³⁾. Las células CD4+ de piel perilesional en pacientes con pénfigo vulgar al ser cultivadas con células CD56+ (dim o bright) expresan el MHC clase II, en presencia de Dg3, secretando IL6, IL8 e INF- γ ⁽³⁾.

Esta posible combinación del MHC clase II expresada por las células NK y los linfocitos T CD4+ en el microambiente de un tejido de una enfermedad específica y en la circulación, facilita y amplifica la producción local y sistémica de un proceso inflamatorio que eventualmente lleva a la producción de altos títulos de auto- anticuerpos ⁽³⁾.

En otro estudio, los investigadores observaron que las células NK CD56+ CD3- estuvieron elevadas en pacientes con pénfigo vulgar. Usando el análisis de expresión genética, demostraron el incremento de la expresión de IL-10, IL-5 y disminución de la expresión de IL-12, perforina y granzima B. Estos autores concluyeron que las células NK promueven la respuesta inmune Th2 a través del deterioro de la señalización de IL-12 y sobre- expresión de IL-10 y IL-5 ⁽⁶⁾.

Marco Teórico

La defensa contra los microorganismos es mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los microorganismos. Los principales componentes de la inmunidad innata son: ⁽⁷⁾

1. Las barreras físicas y químicas como los epitelios y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales.
2. Células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células dendríticas y células NK.
3. Sistema del complemento.
4. Citocinas, proteínas que regulan y coordinan las células de la inmunidad innata.

Los linfocitos citolíticos naturales (células NK) son un subtipo de linfocitos distintos de los linfocitos T y B que desempeñan funciones importantes en la respuesta inmunitaria innata, sobre todo contra virus y bacterias intracelulares; además, limitan el crecimiento de células neoplásicas. El término citolítico natural deriva del hecho de que estas células son capaces de realizar una función citolítica sin necesidad de diferenciación y expansión clonal, lo que es necesario en las respuestas efectoras de las otras células citolíticas del sistema inmunitario como los linfocitos T citotóxicos ⁽⁸⁾.

El mecanismo citotóxico de las células NK es parecido al de los linfocitos citolíticos (CTL), pero, a diferencia de ellos, carecen de especificidad y de memoria, y no están restringidos por el MHC clásico. Ellas constituyen del 5 al 15% de las células mononucleares de la sangre y el bazo, con una vida media corta. Son raros en otros órganos linfáticos; sin embargo, se concentran en órganos como el hígado y el útero grávido. En este último, las células NK tienen un fenotipo diferente a las periféricas, siendo CD3+/CD16-/CD56+ con poca capacidad citolítica y mayor secreción de citocinas ⁽⁸⁾.

Morfológicamente, son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos y surgen de un precursor hematopoyético de la médula ósea, CD34+ que da lugar a dos líneas celulares distintas. Una de estas son las células T y otras son la base para la ontogenia de las células NK. Como las células T y las células NK se desarrollan de un progenitor bipotencial mieloide común, las células NK comparten características similares con los linfocitos T ^(9,10).

Los linfocitos NK no expresan receptores para diversos antígenos distribuidos de forma clonal, típico de los linfocitos T y B. En cambio, usan receptores codificados por ADN en la línea germinal, para distinguir las células infectadas por microorganismos patógenos de las células sanas. Pueden identificarse en la sangre por la expresión en su superficie de CD56 y la falta de CD3, dos proteínas de membrana que a menudo se encuentran juntas en el CTL activado ⁽⁹⁾.

La gran mayoría de los marcadores de superficie disponibles para identificar estas poblaciones celulares se expresan en otros tipos de linfocitos, lo que dificulta la definición de las células NK ⁽⁹⁾.

Funciones de los linfocitos NK

Tienen una amplia diversidad de funciones. Son responsables de combatir las infecciones virales, en especial el herpes virus y juegan un importante papel en la inmunovigilancia tumoral ^(11,12). Una característica peculiar de las células NK uterinas es que influyen en el embarazo ya que están presentes en el útero durante el crecimiento del embrión. Por otra parte, las células NK juegan un papel regulatorio en la inmunidad adaptativa mediante la estimulación de las células T y las células dendríticas, importantes en el proceso de autoinmunidad ⁽¹²⁾.

Se ha demostrado que las células NK difieren en número y función en diferentes enfermedades autoinmunes y que pueden propagar o inhibir la respuesta inmunitaria. Estas juegan un rol importante en la actividad citotóxica y en la producción de citoquinas ^(13,14). La actividad citotóxica de las células NK, puede ocurrir sin previa inmunización, dirigida contra células infectadas por un virus, tumor o a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ⁽¹²⁾.

Las principales citocinas del sistema inmune innato que estimulan la función de las células NK son IL-12, IL-15, IL-18, producidas por macrófagos. Cada una de estas citocinas

realza la actividad citotóxica de los linfocitos NK y la cantidad de la citocina INF- γ que estos secretaran ⁽¹⁵⁾.

Las células NK, secretan citocinas y quimiocinas para llevar a cabo su acción a través de la liberación de sus gránulos intra-citoplasmáticos. Una proteína de los gránulos llamada perforina, facilita la entrada de otras proteínas llamadas granzimas en el citoplasma de la célula diana, destruyéndola. Además, la secreción de INF- γ por las células NK estimula la respuesta inmune Th1, que lleva a la activación de los macrófagos y la producción de Ig G, regula la expresión del MHC clase II a través de la estimulación de las células presentadoras de antígeno y ayuda a inhibir la proliferación celular de virus y tumores e induce la fagocitosis de virus y bacterias por macrófagos ^(15,16).

Reconocimiento de células infectadas y alteradas por los linfocitos NK

Las células NK juegan un rol vital en la regulación dinámica y en la interacción entre la inmunidad innata y adaptativa. Estas células tienen una gran variedad de receptores. Son activadas por la presencia de citocinas o través de la activación de receptores o ambos ⁽¹⁷⁾.

Los linfocitos NK distinguen las células infectadas y alteradas de las sanas, y su activación está regulada por un equilibrio de señales generadas por receptores activadores y receptores inhibidores. Estos receptores reconocen moléculas en la superficie de otras células y generan señales activadoras o inhibidoras que promueven o inhiben a las células NK. En general, los receptores activadores reconocen ligandos situados en células infectadas o dañadas, y los receptores inhibidores reconocen las células sanas ^(8,11).

Cuando un linfocito NK interactúa con otra célula, el resultado viene determinado por la integración de las señales generadas por la serie de receptores inhibidores y activadores que expresa el linfocito NK y que interactúa con los ligandos de otras células ⁽¹¹⁾.

La mayoría de los linfocitos NK expresan receptores inhibidores que reconocen moléculas del MHC clase I, que son proteínas de la superficie celular expresadas normalmente por casi todas las células sanas del cuerpo. Una función importante de las moléculas del MHC clase I, diferente de su papel en la regulación de la activación del linfocito NK, es mostrar péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas, incluidas proteínas microbianas en la superficie celular para su reconocimiento por linfocitos T CD8 ^(15,18).

Muchos virus y otras causas de estrés celular llevan a una pérdida de la expresión del MHC-I y las células NK reciben señales activadoras de las células infectadas a través de

receptores activadores. De este modo, estas células interpretan la presencia de las moléculas del MHC-I como marcadores de lo propio normal y sano, y su falta como una indicación de infección o daño. El resultado será su activación para la secreción de citocinas y la eliminación de la célula infectada o dañada que carece del MHC-I ⁽¹⁵⁾.

Los receptores inhibidores de las células NK comparten la característica común de una estructura en sus colas citoplasmáticas, llamada motivo de inhibición rico en tirosina ligado al receptor inmunitario (ITIM) que se une a moléculas que bloquean la vía de transmisión de señales de los receptores activadores. El ITIM contiene tirosinas que se fosforilan al unirse el ligando a este receptor. Esto conduce al reclutamiento y activación de fosfatasas que eliminan fosfatos de varias proteínas o lípidos productores de señales. El resultado final es el bloqueo de las funciones transmisoras de señales de receptores activadores ^(19,21,22).

Los receptores inhibidores pueden dividirse ampliamente en tres grupos: los receptores del tipo inmunoglobulina del linfocito citolítico (KIR) que reconocen el antígeno leucocitario humano (HLA) clase I-B y I-C, los receptores que pertenecen a la familia de la lectina C, entre ellos el heterodímero CD94/NKG2A que reconoce una molécula de la clase I del MHC llamada HLA-E y los receptores del leucocito del tipo Ig (LIR) que reconocen múltiples moléculas del CMH clase I incluyendo HLA-G ^(21,22).

Los receptores activadores de células NK reconocen un grupo heterogéneo de ligandos algunos de los cuales pueden expresarse en células normales y otros, sobre todo en células que hayan sufrido estrés, estén infectadas con microbios o hayan sido transformadas ⁽¹⁹⁾.

En algunos receptores, una sola cadena polipeptídica contiene los motivos de activación ricos en tirosina ligados al receptor (ITAM) así como la porción que se une al ligando extracelular. En otros receptores, los ITAM están en cadenas polipeptídicas separadas, que no se unen al ligando pero se asocian de forma no covalente a la cadena que se une al ligando. Los ITAM también se encuentran en las colas citoplasmáticas de receptores multicatenarios transmisores de señales del sistema inmunitario, como los receptores para el antígeno de los linfocitos T y B ^(8,19).

Muchos receptores activadores de los linfocitos NK son miembros de la familia de la lectina del tipo C o KIR. Algunos de los receptores activadores parecen unirse a las moléculas de clase I del MHC, como los receptores inhibidores, pero se desconoce como las células

infectadas o dañadas activan preferentemente a estos receptores. Los receptores activadores también reconocen ligando diferentes a las moléculas clásicas del MHC ^(11,20,21).

Un receptor activador de las células NK de la familia de la lectina del tipo C es NKG2D, que se une a proteínas similares de clase I del MHC, como la MIC-A y la MIC-B, que se encuentran en las células infectadas por virus y en células tumorales, pero no en las células normales. El receptor NKG2D se asocia a una subunidad transmisora de señales diferente de la ITAM en otros receptores activadores, pero que también aumenta la citotoxicidad del linfocito NK contra las células diana ^(11,21).

Otro importante receptor activador de los linfocitos NK es CD16 (FcγRIIIa), que es un receptor de baja afinidad para los anticuerpos Ig G. Las moléculas de anticuerpo tienen un extremo que se une al antígeno, que es muy variable, y en el extremo opuesto tiene una estructura constante, llamada región Fc, que interactúa con otras moléculas del sistema inmunitario. La CD16 se une a las regiones constantes (Fc) de ciertas subclases llamadas Ig G1 o Ig G3. Esta se asocia a una de tres proteínas transmisoras de señales que contienen ITAM ^(5,15).

Durante un proceso infeccioso el sistema inmune adaptativo produce estos anticuerpos que se unen específicamente a microbios y a sus antígenos en las células infectadas, y el CD16 de los linfocitos NK puede unirse a las regiones Fc de estos anticuerpos. Como resultado de ello, CD16 genera señales activadoras, y las células NK pueden eliminar células infectadas que están cubiertas de anticuerpos, proceso denominado citotoxicidad dependiente de anticuerpos ^(5,15).

Subpoblaciones de células NK

Se describen diferentes subpoblaciones de células NK dependiendo de la expresión de sus marcadores CD16 y CD56. Las células CD56^{dim} y CD16^{bright} se encuentran en sangre periférica y forman el 90% de todas las células NK en adultos sanos. Las células CD56^{dim} tienen receptores tipo KIR, LIR y CD94/NKG2A. Estas células migran en principio a sitios de inflamación aguda ^(5,23).

Por otro lado, hay otro subtipo de células NK que son CD56^{bright} y CD16- que corresponden al 3-5% de las células NK en sangre periférica, mientras que el 5-7% son CD56^{bright} y CD16^{dim} ⁽²³⁾.

Las células NK CD56^{bright} presentan receptores CD94/NKG2A solamente y son menos citotóxicas; su principal rol está en la secreción de citocinas. Estas constituyen el principal tipo de células NK en los ganglios linfáticos y migran desde este sitio a los órganos linfoides secundarios y sitios de inflamación crónica ⁽²³⁾.

Las células NK también pueden ser agrupadas en diferentes subtipos dependiendo de su localización, de las citocinas estimuladoras y del perfil de producción. Las células NK1 son estimuladas por la IL-12 y IL-18, la cual es muy efectiva induciendo la producción de INF- γ y produciendo TNF- α . Las células NK2 son inducidas por la IL-4 y produce IL-5 y IL-13. Las células NK reguladoras o células tipo NK3 juegan un papel importante tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo. Estas son estimuladas por IL-2 y producen IL-10 y TGF- β ^(11,24).

Otro importante subgrupo son las células NK22 que tienen la capacidad de producir IL-22. Estas células son el único subtipo que no produce IL-17. Están localizadas principalmente en la mucosa de las amígdalas y el intestino, así como en la piel en donde son inducidas por la IL-23. La IL-22 protege a las células epiteliales de las mucosas de patógenos inflamatorios ⁽²⁵⁾.

Células NKT

Otro tipo de células T son las células NKT que comparten algunas similitudes con las células NK. Estas células son consideradas parte del sistema inmune innato, expresan un receptor de células T semi-variante formado por cadenas V α 24-J α 18 y V β 11 en los seres humanos. Estas células, son activadas cuando el CMH clase I presenta la proteína CD1d ⁽²⁶⁾.

Expresan en su superficie los receptores CD16, CD3, CD44, CD69 y CD122, similar a las células de memoria o a las células T activadas. También, al igual que las células NK, secretan INF- γ y TNF- α al ser estimuladas. Una importante diferencia entre las células NK y NKT es que estas últimas no juegan un papel en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ^(26,27). Las células NKT pueden afectar la progresión de la autoinmunidad a través de varios mecanismos, mediante la interacción directa con otras células o mediante la producción de citocinas que pueden modular una gran variedad de tipos celulares ⁽²⁶⁾.

Estas células promueven la desviación hacia la respuesta Th2, induciendo anergia o provocando la apoptosis en las células T patógenas, resultando en la disminución de auto-anticuerpos. También promueven la generación de células dendríticas tolerogénicas e influyen

en la expansión de las células T reguladoras. Al hacerlo, suprimen la respuesta Th1-autoantígeno específico y mejoran las respuestas Th2; de esta manera las células NKT pueden ser importantes en el equilibrio de las respuestas Th1 y Th2 ^(26,28). Ellas secretan IL-10 y TGF- β que suprimen las células Th1 y Th2 patógenas. Producen IFN- γ que induce anergia o apoptosis promoviendo la respuesta inmune Th1. La secreción de IL-1, IL-10, y de factores de granulocitos-monocitos estimulantes de colonias reclutan células dendríticas que promueven la respuesta Th2 ⁽²⁶⁾.

El papel de las células NKT en la reducción de la inflamación en la enfermedad autoinmune ha sido reportado en diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico en modelos animales, miastenia grave y artritis reumatoide en los seres humanos. Además, se ha encontrado un número reducido de células NKT en pacientes con esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, y en la enfermedad de Graves ⁽²⁶⁾.

Rol de las células NK y genética en las enfermedades autoinmunes

El desarrollo y función de las células NK están relacionados con elementos genéticos. Los defectos y variaciones en los genotipos KIR/MHC, pueden influir en la función de un receptor de células NK dado por el reconocimiento de una célula diana así como la auto-tolerancia. Esta influencia se supone que está relacionada con la autoinmunidad ⁽²⁹⁾. Varios estudios han señalado asociaciones entre el riesgo de enfermedades autoinmunes órgano específicas y los genotipos KIR/MHC, lo cual indica que la auto-tolerancia se puede romper con la formación de pares receptor- ligando inapropiados ⁽³⁰⁾.

En general, la presencia de un receptor activador contra MHC clase I asociado con la pérdida o reducción de un receptor inhibitorio ha sido asociado con enfermedades autoinmunes, sugiriendo que un desbalance a favor de los receptores activadores para MHC clase I está asociado a autoinmunidad ⁽³¹⁾.

Características de las células NK en enfermedades autoinmunes de la piel

Se ha demostrado que las células NK juegan un rol importante en algunas enfermedades de la piel. Las citocinas IL-22, IL-17 y el INF- γ parecen ser importantes en la progresión de las enfermedades de la piel como psoriasis, alopecia areata y enfermedades ampollares autoinmunes como pénfigo vulgar ^(32,33).

En la psoriasis, los estudios de leucocitos en sangre periférica y en tejido revelan los elevados niveles de células NK, INF- γ y de TNF- α . En la alopecia areata, en los folículos

pilosos afectados, las células NK están activadas, los niveles del receptor activador NKG2D aumentan, al igual que las células NK22 ⁽³²⁾.

Rol de las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes

El pénfigo vulgar es una enfermedad mucocutánea autoinmune que puede afectar piel, conjuntiva, mucosa nasal, cavidad oral, faringe, laringe, epiglotis, esófago, genitales y canal anal. Las ampollas son flácidas y la decapitación de las mismas resulta en erosiones ⁽³⁴⁾.

En esta entidad, existen auto-anticuerpos dirigidos contra la desmogleina 1 (Dsg1) y desmogleina 3 (Dsg3), que son moléculas de adhesión en la piel y en membranas mucosas. La unión de estos anticuerpos a los antígenos, resulta en la separación de los queratinocitos en un proceso llamado acantolisis con la formación de una ampolla intraepidérmica. Solo se han encontrado dos estudios en la literatura, que se han enfocado en el rol de las células NK en el pénfigo vulgar ⁽³⁵⁾.

La interacción de CD56+ CD3- y los linfocitos T CD4+, produce un perfil de citocinas y quimiocinas que pueden explicar parcialmente la inflamación observada en los tejidos enfermos y la producción de auto-anticuerpos específicos. Las células CD4+ de la piel perilesional en pacientes con pénfigo vulgar, al ser cultivadas con células CD56+ (dim o bright), expresan el MHC clase II, en presencia de Dg3, secretando IL6, IL8 e INF- γ ^(3,11).

Esta posible combinación del MHC clase II expresada por las células NK y los linfocitos T CD4+ en el microambiente de un tejido de una enfermedad específica y en la circulación facilita y amplifica la producción local y sistémica de un proceso inflamatorio que eventualmente lleva a la producción de altos títulos de auto- anticuerpos ^(3,11).

Se ha planteado un rol hipotético de las células NK en la patogénesis del pénfigo vulgar, en donde las células de Langerhans de la piel y tejido mucoso producen citocinas que reclutan células NK. Además, estas células favorecen la disponibilidad de Dg3 de los queratinocitos circundantes a otras células del tejido mucoso o piel ^(3,11).

Junto con los linfocitos CD4+, las células NK se comportan como células presentadoras de antígenos facilitando la producción local de citocinas y otros mediadores inflamatorios. Las células NK presentan péptidos de Dg3 a las células CD4+ y estas a su vez producen IL-6, la cual estimula a las células B residentes a generar anticuerpos anti-Dg3 ^(3,11).

Las células CD4+, células B, células NK, citocinas y quimiocinas que ellas producen, probablemente pasan a la circulación. A su llegada a la médula ósea, el bazo y los ganglios

linfáticos amplían la respuesta inmune y una vez que alcanzan niveles críticos, se produce la enfermedad clínica ^(3,11).

La IL- 6 es una citocina pleiotrópica importante en la regulación de la respuesta inmune, en las reacciones de fase aguda y en la hematopoyesis está involucrada en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes, linfoproliferativas y en la inflamación. En el microambiente de la piel, mucosas y en la medula ósea en el pénfigo vulgar, esta IL puede jugar un papel importante en la producción de auto-anticuerpos anti-Dg ^(3,11).

También se demostró que las células NK al ser cultivadas con linfocitos CD4+ de la piel perilesional, en presencia de Dg3, producen altos niveles de IL-8, jugando un papel importante en el reclutamiento y activación de células polimorfonucleares en los sitios de inflamación. También es conocido que esta IL-8 y otras quimiocinas inflamatorias tienen un papel importante en los desórdenes autoinmunes órgano- específico a través del reclutamiento de leucocitos y polimorfonucleares al tejido afectado ^(3,11).

Objetivo General

Determinar los valores de las células NK en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de enfermedades ampollares autoinmunes en actividad que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas comparado con controles sanos.

Objetivos específicos:

1. Determinar los niveles relativos y absolutos de células NK en sangre periférica de pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en actividad comparándolos con controles sanos.
2. Identificar los subtipos de células NK CD56+/CD16+ “dim” y “bright” en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en actividad y en controles sanos.
3. Comparar los niveles de células NK y sus subtipos en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en tratamiento con corticoesteroides sistémicos y sin tratamiento.
4. Determinar valores de las células CD3+ en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en actividad y en controles sanos.

5. Determinar niveles de células las NKT en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes y en controles sanos.

Aspectos Éticos

Las autoras del presente trabajo tomaron en cuenta los principios básicos de Bioética. Se respetó el principio de beneficencia y no maleficencia debido a que la intención del trabajo fue ampliar los conocimientos dermatológicos en los casos de enfermedades ampollares autoinmunes. Se diseñó un formulario de Consentimiento Informado que cumplió con las normas inherentes para ampliar este tipo de investigación.

En cuanto a los principios éticos y legales se destacan:

- Observación y cumplimiento de claros principios éticos y/o legales en relación con la provisión o suspensión del cuidado médico; el respeto de la dignidad del paciente; su derecho en la privacidad y confidencialidad; derecho al mejor cuidado posible, a la autonomía y al Consentimiento Informado; derecho a rechazar tratamientos o a formar parte en actividades de docencia, investigación o prácticas comerciales.
- Analizar y aplicar la legislación y código deontológico vigentes relativos al ejercicio de la medicina y del sistema de salud para guiar su propia práctica clínica.
- Reconocer, analizar y denunciar conductas no profesionales en la práctica clínica, en el marco de las regulaciones institucionales, locales y nacionales.
- Evaluar los aspectos éticos de la práctica clínica y de investigación, e identificar los valores y conflictos ocultos.
- Promover en el paciente el respeto a los principios éticos de la práctica médica ⁽¹²⁾.

En esta investigación se reflejó lo expuesto en la Declaración de Helsinki que resalta el deber del médico en promover y velar por la salud de los pacientes que participan en investigaciones médicas. Así mismo, en el numeral 7, expone que el propósito de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas como los métodos, procedimientos y tratamientos ⁽¹³⁾.

MÉTODOS

Tipo y diseño de la investigación

Esta investigación se define como un estudio de cohorte observacional, prospectivo, unicéntrico y transversal.

Población y muestra:

La población objeto de estudio estuvo conformada por pacientes que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas con diagnóstico de enfermedad ampollar autoinmune atendidos desde febrero 2016 hasta agosto 2016, así como de un grupo control sano.

La muestra fue intencional y no probabilística.

Criterios de Inclusión:

- a) Pacientes mayores de 18 años de edad con diagnóstico de enfermedades ampollares autoinmunes en actividad confirmada por el estudio histopatológico de piel.
- b) Pacientes que aceptaron participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado (anexo 3).

Criterios de Exclusión:

- a) Pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en remisión.
- b) Pacientes con patologías crónicas de base.
- c) Pacientes que recibieron tratamiento con corticoesteroides por más de 72 horas.
- d) Pacientes que recibieron tratamiento con otros inmunosupresores diferentes a corticoesteroides.
- e) Pacientes que no aceptaron participar en el estudio a través del Consentimiento Informado.

Variables del estudio

Dependiente: niveles de células NK circulantes.

Independientes: sexo, edad, subtipo de enfermedad ampollar autoinmune, tratamiento.

Procedimiento de la investigación

El instrumento de recolección de datos del presente estudio (anexo 1), estuvo estructurado en tres segmentos, el primero corresponde a la ficha patronímica del paciente que contiene datos de identificación; epidemiológicos como edad, sexo y procedencia; datos clínicos como tipo de enfermedad ampollar autoinmune, actividad de la enfermedad, definida como presencia de lesiones independientemente del número y grado de severidad de al menos 8 días de evolución, además del cumplimiento o no de la administración de corticoesteroides sistémicos (prednisona). El segundo segmento incluyó datos de laboratorio; entre ellos: niveles de células NK y sus subtipos (dim y bright) y niveles de linfocitos CD3+ y NKT y por ultimo un tercer segmento que reflejó los valores de hematología completa.

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas por razones de procesamiento únicamente los días martes y jueves de cada semana y analizadas en el Laboratorio del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela; es por esta razón que se tomó como criterio un tiempo de administración de corticoesteroides menor a 72 horas, en vista de que algunos pacientes se encontraban recibiendo tratamiento con prednisona pues su condición clínica no permitía postergar la administración del fármaco hasta el día de la toma de muestra.

Cuantificación de las células NK y NKT por citometría de flujo

Se tomaron 100 μ L de sangre total a los cuales se les realizó marcaje con 20 μ L de una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con dos fluorocromos [IOTest CD3-FITC/CD(16+56)-PE] de la casa comercial Immunotech SAS de Beckman Coulter Company, Marseille, France: anti- CD3 (anticuerpo monoclonal UCHT1 que reacciona con la cadena ϵ del complejo CD3 sobre los linfocitos T y NKT) conjugado con isocianato de fluoresceína (FIT) y anti-CD56 (anticuerpo monoclonal contra NKH-1, la proteína CD56 altamente glucosilada específica de las células NK y NKT) y anti-CD16 (anticuerpo monoclonal 3G8 que reconoce al complejo CD16 o Fc γ RIIIa). Estos dos últimos anticuerpos están conjugados

con ficoeritrina (PE). Seguidamente las muestras marcadas fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente, por 10 minutos; transcurrido ese tiempo, las mismas fueron sometidas a un procedimiento automatizado de lisis de glóbulos rojos y fijación de células blancas en el Q-prep (Coulter Company) y posteriormente analizadas por citometría de flujo (Coulter EpicsXL.MCL). La citometría de flujo permitió evaluar de manera sensible y rápida las poblaciones celulares de interés.

Primero se realizó un mapa electrónico sobre la población de linfocitos de acuerdo a su tamaño y granularidad. Sobre ese mapa se evaluó las diferentes subpoblaciones del estudio. Fijando los ejes respectivos, se determinó el porcentaje de células CD56+/CD16+^{bright}, CD56+/CD16+^{dim}, porcentaje total de NK (CD56+/CD16+CD3-) de NKT (CD3+/CD56+/CD16+) y el total de linfocitos T CD3+.

Tratamiento estadístico

El análisis consistió primeramente en verificar si la distribución de datos de las variables cuantitativas, tanto de hematología como de células NK y sus subtipos, NKT y linfocitos CD3+ tenían una distribución Normal, para ello se utilizó la prueba Shapiro-Wilk; cuando las variables tenían distribución Normal, se calculó su promedio y desviación estándar, en caso contrario, su mediana e intervalo de confianza al 95%. A las variables nominales, se les calculó sus frecuencias y porcentajes. Las diferencias de promedios entre grupos se evaluaron con la prueba t de Student para muestras independientes; la diferencia de medianas se basó en la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney; por último, la diferencia entre variables nominales, se basó en la prueba chi-cuadrado de Pearson. Los contrastes fueron de tipo bilateral. Para el análisis de variables múltiples se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba post-hoc de Dunnett. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando la $p < 0,05$. Los datos fueron analizados con R-Studio 2.30 y reportados posteriormente en programa SPSS v24.

RESULTADOS

Luego de la fase de elaboración de tablas y cuadros que consolidan la data registrada en los instrumentos empleados para la recolección de los datos en la fase de trabajo de campo, se obtuvieron los siguientes resultados:

1. De un total de 18 pacientes incluidos en el trabajo se observó que la edad promedio de presentación al momento de la toma de muestra fue de 49 ± 15 años con predominio del sexo femenino en el 55,6% de los casos; estos fueron comparados con 16 controles con edad promedio de 45 ± 11 años de los cuales 50% eran del sexo femenino (Tabla 1). La mayoría de los pacientes tenían diagnóstico de pénfigo vulgar (44,4%) seguido de foliáceo (27,8%), penfigoide ampollar (11,1%), enfermedad por IgA lineal (5,6%), epidermólisis ampollar adquirida (5,6%) y pénfigo paraneoplásico (5,6%) (Tabla 2). De las muestras tomadas para su análisis 77, 8% correspondían a pacientes con diagnóstico de enfermedad ampollar autoinmune de novo y 22,2% presentaban recaída de su enfermedad. Al momento de la toma de muestra de sangre 72,2% se encontraban recibiendo tratamiento con corticoesteroides sistémicos vs 27,8% que no recibieron ningún tratamiento (Tabla 2).
2. Al realizar la distribución de pacientes y controles según valores de glóbulos blancos se determinó que los pacientes tenían valores más altos en relación a los controles sanos con una p estadísticamente significativa ($p=0,011$), a expensas de valores de neutrófilos ($p=0,04$); así como aumento de los valores de monocitos y eosinófilos ($p=0,001$) (Tabla 3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a valores de hemoglobina, hematocrito y plaquetas (Tabla 4).
3. La media de células NK fue de 9,5% (175 mm³) en relación a los controles 10,2% (209 mm³) sin significancia estadística (Tabla 5). En vista de estos resultados se realizó el análisis de varianza (ANOVA) comparando los valores de células NK de los pacientes con corticoesteroides sistémicos y los controles sanos observando disminución de los niveles en este grupo de pacientes (7,1% vs 10,2% respectivamente) con una p estadísticamente significativa ($p=0,002$) (Tabla 6). Al comparar los valores de NK en pacientes sin corticoesteroides sistémicos con controles sanos a través de prueba t de Student se demostraron valores de NK más altos en los

pacientes comparados con los controles, sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 7).

4. Se identificaron los subtipos de células NK CD56 dim y bright en pacientes y controles observando valores de NK bright más bajos en los pacientes en relación a los controles sanos (1,6% vs 3,4% respectivamente) con una p estadísticamente significativa ($p=0,001$) (Tabla 5). El análisis de varianza de los valores de NK bright de pacientes que recibieron corticoesteroides sistémicos comparado con controles sanos determinó también una disminución de sus niveles ($p=0,001$) (Tabla 6). Los valores de NK CD56 dim (mm³) en pacientes sin corticoesteroides sistémicos fueron más altos comparados con controles sanos con una p estadísticamente significativa ($p=0,037$) (Tabla 7).
5. Comparando los niveles de células NK en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en tratamiento con corticoesteroides sistémicos y sin tratamiento se pudo determinar que los pacientes que recibían corticoesteroides tenían valores de células NK más bajos que aquellos pacientes que no recibían tratamiento, con una p estadísticamente significativa ($p=0,001$). Al evaluar los subtipos de células NK se observó que presentaban NK CD56 dim más bajas (6,1 % con corticoesteroides vs 13,3% sin corticoesteroides) con una p de 0,007 (Tabla 8).
6. No se demostró diferencias estadísticamente significativas en los valores de linfocitos CD3+ de los pacientes comparado con los controles sanos (Tabla 5).
7. Los valores de células NKT fueron diferentes en los grupos de pacientes y controles, demostrando valores de NKT más altos en los pacientes (0,34%) en relación a los controles (0,06%) con una p estadísticamente significativa ($p=0,047$) (Tabla 5). Los valores de NKT fueron más altos en los pacientes que recibían tratamiento con corticoesteroides (0,44%) vs controles sanos (0,06%) $p=0,034$ (Tabla 6) y cuando se compararon estas células en pacientes que recibieron corticoesteroides con pacientes sin corticoesteroides se observó valores de NKT mm³ más altos en los pacientes con tratamiento (7,0 mm³ vs 1,1 mm³ respectivamente) $p=0,010$ (Tabla 8).

DISCUSIÓN

Al analizar los resultados del presente trabajo, se demostró que la edad promedio de presentación de enfermedades ampollares autoinmunes fue de 49 años con predominio del sexo femenino en el 55,6% de los casos, similar a otros estudios reportados anteriormente donde se observa que las edades con mayor riesgo de presentación están entre 34 y 53 años con tendencia al sexo femenino ⁽³⁶⁾. Las enfermedades ampollares autoinmunes más frecuentes son pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo ⁽³⁷⁾, en este estudio se comprobó que el pénfigo vulgar representó el subtipo más frecuente con 44,4% de la muestra seguido de pénfigo foliáceo con 27,8%. La mayoría de los pacientes estaban recibiendo tratamiento con corticoesteroides sistémicos al momento de la toma de muestra 72,2%.

Los valores de glóbulos blancos fueron diferentes en los pacientes en relación a los controles sanos, observando glóbulos blancos más altos en relación a los controles, a expensas de valores de neutrófilos, este hallazgo podría deberse a que la mayoría de los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento con corticoesteroides sistémicos que producen elevación de dichos valores ⁽³⁸⁾.

Estudios previos publicados en la literatura demostraron el aumento de los valores de células NK en pacientes con pénfigo vulgar en actividad y sin tratamiento con corticoesteroides ^(3,6). En nuestra serie de casos, no se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre los valores de células NK de los pacientes y los controles sanos; esto puede ser debido a los altos valores en la desviación estándar observados en el grupo de pacientes, sin embargo al comparar los valores de células NK de pacientes que no recibían tratamiento con corticoesteroides sistémicos se observó un aumento de sus niveles en relación a los controles sanos con una *p* sin significancia estadística (*p*=0,092) probablemente motivado al menor número de pacientes en este grupo (*n*=5). Al excluir a aquellos pacientes que no recibieron tratamiento se observó una disminución estadísticamente significativa de las células NK que pudiera relacionarse al uso de estos fármacos (corticoesteroides); estos hallazgos fueron demostrados en un estudio reciente donde el uso de dexametasona en pacientes con diagnóstico de enfermedad de injerto contra huésped provocó la inhibición de la fosforilación de STAT 4 y STAT 5 de las células NK, disminuyendo de esta forma sus valores en sangre periférica ⁽³⁹⁾.

Las células NK bright en condiciones normales representan la minoría de las células NK (<10%) ⁽⁴⁰⁾, las mismas estuvieron disminuidas en los pacientes en relación a los controles, mientras que no hubo diferencia estadísticamente significativa con las NK dim cuando se realizó el análisis comparando todos los pacientes con controles sanos, sin embargo al realizar el análisis por subgrupo se pudo determinar que los pacientes que no recibían tratamiento con corticoesteroides sistémicos obtuvieron valores de NK dim más altos que los controles sanos, demostrando su papel citotóxico relevante en patologías inflamatorias autoinmunes, en este caso en enfermedades ampollares, así como la disminución en sus niveles con el uso de corticoesteroides sistémicos comparado con pacientes sin tratamiento. Las células NK dim representa el subtipo de célula NK con niveles más altos en sangre ⁽⁴¹⁾ razón por la cual se pudieron obtener valores de bright más bajos en los pacientes al compararlos con controles, no así con los niveles de NK dim (valores similares en relación a controles); por lo que se sospecha que se necesita un tiempo más prolongado en la administración de corticoesteroides (>72 horas) para lograr disminuir sus niveles por debajo de los niveles de los controles sanos.

Al observar el comportamiento de las células NK de los pacientes que recibieron corticoesteroides se destaca el rol de estos fármacos en disminuir los valores de células NK y su subtipo NK dim cuando se compararon con pacientes en actividad que no recibían tratamiento con corticoesteroides. Hasta la fecha no existen estudios publicados que evalúen el comportamiento de las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes en pacientes en tratamiento con corticoesteroides sistémicos.

Los linfocitos T periféricos expresan en su superficie una gran variedad de receptores, entre ellos el receptor de células T (TCR) el cual les confiere especificidad antigénica. El complejo CD3 está formado por 4 polipéptidos transmembrana y a través de su unión a TCR favorece su expresión y media mecanismos de señalización intracelular ⁽⁴²⁾. En este estudio no se demostraron diferencias entre los valores de linfocitos CD3 en los diferentes subgrupos, pudiendo inferir que su papel es menos relevante en relación a las células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.

En la literatura se reporta que las células NKT cumplen un rol fundamental en la inflamación en enfermedades autoinmunes como diabetes tipo 1, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico en modelos animales y en miastenia gravis y artritis reumatoidea en humanos, observándose que se encuentran disminuidas en pacientes con esclerosis sistémica,

síndrome de Sjögren y enfermedad de Graves. En nuestro estudio los valores de células NKT estuvieron más elevados en los pacientes que recibieron corticoesteroides cuando se compararon con controles sanos y con pacientes sin corticoesteroides y esto fue estadísticamente significativo, destacando la participación de los corticoesteroides sistémicos en la activación de las células NKT para regular el proceso inflamatorio de estas enfermedades ampollares autoinmunes ⁽¹¹⁾.

Conclusiones

Se presenta una serie de casos en donde se demostró que las células NK y sus subtipos así como las células NKT, participan en la patogénesis de enfermedades ampollares autoinmunes, siendo este el primer estudio donde se analizan estas células en otras enfermedades ampollares diferentes a pénfigo vulgar.

Las células NK y su subtipo NK dim se encuentran aumentadas en los pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en actividad que no reciben tratamiento con corticoesteroides sistémicos y el uso de estos fármacos modifica sus valores en sangre periférica; constituyendo esto un aporte novedoso en el conocimiento de la fisiopatología de este grupo de enfermedades ampollares autoinmunes.

Recomendaciones

1. Realizar un nuevo estudio en pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes que no reciben tratamiento con corticoesteroides sistémicos.
2. Realizar futuros estudios en donde se determine los valores de células NK en enfermedades ampollares autoinmunes por separado. Ejemplo: pénfigo sin incluir el resto de las enfermedades ampollares.
3. Realizar un estudio que permita determinar el comportamiento de células NK al inicio del tratamiento y posterior al uso crónico de corticoesteroides sistémicos.
4. Estudiar el comportamiento de las células NK en muestras de piel de pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes en actividad.

AGRADECIMIENTOS

Al director del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela Dr. Juan de Sanctis por permitirnos trabajar en el área física de la institución y facilitar los reactivos usados para la determinación de las células NK. También agradecemos a la licenciada Soriuska Mayora quien ayudo al procesamiento de las muestras.

A la Dra. Elizabeth De Kok de la consulta de enfermedades ampollares del Servicio de Dermatología y Sifilografía del Hospital Universitario de Caracas por impulsarnos en la realización de este proyecto, al grupo de residentes del servicio que participaron en el reclutamiento de los pacientes y a los adjuntos por las recomendaciones brindadas para su elaboración.

REFERENCIAS

1. Trinchieri G. Biology of Natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989; 47:187-376
2. Zitvogel L, Terme M, Borg C, Trinchieri G. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 298:157-174
3. Stern J, Keskin D, Barteneva N, Zuniga J, Yunis E, Ahmed A. Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris- preliminary observations. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152: 472- 481
4. Ugolini S, Vivier E. Immunology: Natural killer cells remember. *Nature.* 2009; 457(7229):544–545.
5. Von Bubnoff D, Andres E, Hentges F, Bieber T, Michel T, Zimmer J. Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(1): 60–68.
6. Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T et al. T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(2):324–330.
7. Flajnik M, Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol.* 2004; 25: 640-644
8. Abbas A, Lichtman A, Shiv P. *Inmunología celular y molecular.* 7ma ed. España: ELSEVIER; 2012.
9. Suzuki R, Takeuchi K, Ohshima K. Extranodal NK/T-cell lymphoma: Diagnosis and treatment clues. *Hematol Oncol* 2008; 26(2):66–72.
10. Greer JP, Mosse CA. Natural killer-cell neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009; 4(4):245–252.
11. Zakka L, Frandkov E, Keskin D, Tabansky I, Stern J, Ahmed A. The role of the natural killer cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity.* 2012; 45: 44-54
12. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011; 331(6013):44–49.
13. Perricone R, Perricone C, De Carolis C, Shoenfeld Y. NK cells in autoimmunity: A two-edge weapon of the immune system. *Autoimmun Rev.* 2008; 7(5):384–390.

14. Lunemann A, Lunemann JD, Munz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 2009; 15(9–10):352–358.
15. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008; 112(3): 461–469.
16. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005; 42(4):501–510.
17. Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep*. 2009; 10(10):1103–1110.
18. Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U et al. Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. 2003; 19(4): 561–569.
19. Von Bubnoff D, Andres E, Hentges F, Bieber T, Michel T, Zimmer J. Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(1):60–68.
20. Lanier LL. NK cell recognition. *Ann Rev Immunol*. 2005; 23: 225–274.
21. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology*. 2006; 117(1):1–10.
22. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(11):850–861.
23. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56 bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology*. 2009; 126(4):458–465.
24. Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol*. 1998; 161(11):5821–5824.
25. Colonna M. Interleukin 22 producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity*. 2009; 31(1):15–23.
26. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med*. 2009; 9(1):4–14.
27. Johansson S, Berg L, Hall H, Höglund P. NK cells: Elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol*. 2005; 26(11):613–618.

28. Ly D, Mi QS, Hussain S, Delovitch TL. Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4 þ CD25 þ regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(6):3695–3704.
29. Wood KJ, Bushell A, Jones ND. Immunologic unresponsiveness to alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2011; 241:119–32.
30. Flodstrom-Tulberg M, Bryceson YT, Shi F-D, Hoglund P, Ljunggren H-G. Human natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2009 21:634–40.
31. Tian Z, Gershwin ME, Zhang C. Regulatory NK cells in autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2012; 39:206–15.
32. Poggi A, Zocchi M. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2014; 5(27): 1-13
33. Bos JD, De Rie MA, Teunissen MB, Piskin G. Psoriasis: Dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol*. 2005; 152 (6):1098-1107
34. Becker BA, Gaspari AA. Pemphigus vulgaris and vegetans. *Dermatol Clin*. 1993; 11:429–52.
35. Sami N, Ahmed AR. Dual diagnosis of pemphigus and pemphigoid. Retrospective review of thirty cases in the literature. *Dermatol*. 2001; 202(4):293–301.
36. Saha M, Bhogal B, Black MM, Cooper D, Vaughan RW, Groves RW. Prognostic factors in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 2014; 170:116–122
37. Matos R, Bascones A. Pénfigo: una revisión de la literatura. *Avances en Odontoestomatología* 2009;67-82
38. Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Recio JS, Weruaga E, De Dios I. Effect of dexamethasone on peripheral blood leukocyte immune response in bile-pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Steroids*. 2010; 75(4-5):362-367.
39. Michelo CM, Fasse E, Van Cranenbroek B, Linda K, Van der Meer A, Abdelrazik H et al. Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early Natural Killer cell activation. *Transpl Immunol*. 2016; 37: 1-9.
40. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiure MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-640

41. Abakushina EV. The technique of flow cytometry in evaluation of nk-cells and their activity. *Klin Lab Diagn.* 2015;60(11):37-44.
42. Skapenko A, Leipe J, Lipdky P, Schuleze- Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 2005; 7(2): S4-S14.

ANEXOS

ANEXO 1.

FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS



SEGMENTO 1:

Datos de identificación

- Nombre y Apellidos: _____
- C.I: _____
- HUC: _____
- Edad: _____
- Sexo: _____
- Procedencia: _____

Datos clínicos

- Enfermedad ampollar autoinmune: _____
- Reciente diagnóstico: _____ Recaída: _____
- Prednisona: SI _____ NO _____

SEGMENTO 2:

Datos de laboratorios inmunológicos

NK (CD3/CD56+/CD16+)	Bright (dec)	Bright (%)	Dim (dec)	Dim (%)	NK (dec)	NKT (%)	CD3+ (dec)	CD3+ (%)

SEGMENTO 3

Hematología completa

Leucocitos	Segmentados	Linfocitos	Eosinófilos	Basófilos	
Hemoglobina	Hematocrito	Plaquetas			

ANEXO 2.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “CÉLULAS NK EN ENFERMEDADES AMPOLLARES AUTOINMUNES”

Usted ha sido seleccionado para formar parte de una evaluación que será llevado a cabo por los residentes del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas, a propósito de la investigación denominada células NK en enfermedades ampollares autoinmunes. De usted necesitar una información adicional con respecto a lo expuesto en la Hoja de Información al paciente, debe solicitarla al investigador responsable del proyecto: Dra. María Carolina Hernández o Dra. Perla Meneses, quienes aclararan cualquier duda que pudiera tener al respecto.

Propósito del proyecto:

Averiguar los niveles de células Natural Killer en pacientes con diagnóstico de enfermedades ampollares autoinmunes en crisis que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas durante el periodo comprendido entre febrero 2016 y agosto 2016.

Procedimiento:

De usted aceptar participar en el estudio, se le elaborará una historia clínica. El tiempo de duración de la entrevista es de 20 minutos aproximadamente. Adicionalmente, se tomará una muestra de sangre de 10 cc para realizar estudios de laboratorio por una persona experimentada.

Riesgos:

No existe ningún riesgo para su participación en este estudio.

Beneficios:

La participación en esta investigación tiene como beneficio, sin remuneración económica para su persona, la posibilidad de entender las causas de las enfermedades ampollares autoinmunes, que podrían permitir desarrollar nuevos tratamientos. La información que usted proporcione es totalmente confidencial.

Participación voluntaria:

Su participación es voluntaria y usted puede retirarse del estudio aún después de dar su aprobación para participar. Puede negarse a responder cualquier pregunta de la historia. Puede hacer cualquier pregunta al investigador.

ANEXO 3.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Su firma en este consentimiento informado indica que comprende el contenido de la hoja de información al paciente que acompaña este formulario y que acepta su participación en la investigación bajo la modalidad que usted indica abajo.

Yo, _____, CI N° _____ de ____ años de edad, he leído y comprendido el contenido de la hoja de información al participante del proyecto de investigación denominado células NK en enfermedades ampollares autoinmunes, aclarando todos las dudas que he tenido al respecto, en forma satisfactoria.

En este sentido, por medio la presente proporciono mi consentimiento para participar en la referida investigación, en los procedimientos indicados en la historia clínica

Procedimiento	Acepto	No acepto
---------------	--------	-----------

Llenado de la historia clínica		
--------------------------------	--	--

En mi calidad de voluntario, reconozco que no estoy obligado a firmar este consentimiento, y aun habiéndolo firmado, puedo retirarme en cualquier momento durante la ejecución de los procedimientos previamente aceptados por mi persona, sin perjuicio alguno. Con mi firma certifico, que este consentimiento lo acepto de manera voluntaria sin presiones de ninguna tipo, y que mi participación se realizará el día _____. Además reconozco recibir el acto de esta firma, una copia del presente consentimiento y de la hoja de información correspondiente.

Nombre _____ Paciente: _____ Testigo: _____

Investigador _____ Fecha: _____

ANEXO 4

Tabla 1.
Distribución de pacientes por edad y sexo según grupos.
Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.
Período febrero a agosto, 2016.

Variables	Pacientes		Controles	
N	18		16	
Edad (años)(*)	49 ± 15		45 ± 11	
Sexo				
Masculino	8	44,4%	8	50,0%
Femenino	10	55,6%	8	50,0%

Edad: $t = 0,888$ ($p = 0,381$)

Sexo: $\chi^2 = 0,105$ ($p = 0,746$)

(*) media ± desviación estándar

Tabla 2.
Características de los pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes.
Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.
Período febrero a agosto, 2016.

Variables	N	%
Diagnósticos		
Pénfigo vulgar	8	44,4
Pénfigo foliáceo	5	27,8
Penfigoide ampollar	2	11,1
Enfermedad por IgA lineal	1	5,6
Epidermolisis ampollar adquirida	1	5,6
Pénfigo paraneoplásico	1	5,6
Evolución		
Nuevo	14	77,8
Recaída	4	22,2
Tratamiento		
Con corticoesteroides	13	72,2
Sin corticoesteroides	5	27,8

Tabla 3.
Distribución de pacientes y controles según glóbulos blancos por grupos.
Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.
Período febrero a agosto, 2016.

Variables	Pacientes	Controles	P
N	18	16	-
Glóbulos blancos (mm3)	7865 (7000 - 10006)	6628 (5868 - 7403)	0,011
Neutrófilos (mm3)	5545 (4322 - 7185)	4300 (3764 - 4800)	0,004
Linfocitos (mm3)	2160 (1440 - 2512)	1950 (1800 - 2236)	0,986
Monocitos (mm3)	708 (527 - 867)	310 (243 - 502)	0,001
Eosinófilos (mm3)	85 (60 - 200)	20 (10 - 30)	0,001
Valores expresados como mediana (IC-95% de la mediana)			
Valores-p reportados para una cola de contraste			

Tabla 4.

Distribución de pacientes y controles según glóbulos rojos y plaquetas por grupos.

Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.

Período febrero a agosto, 2016.

Variables	Pacientes	Controles	P
N	18	16	-
Hemoglobina (gr/dl)	13,1 ± 2,1	13,1 ± 0,8	0,971
Hematocrito (%)	40,3 ± 5,0	38,3 ± 3,3	0,188
Plaquetas (mm3)	294000 ± 94241	247653 ± 43084	0,097

Valores expresados como media ± desviación estándar

Tabla 5.

Distribución de pacientes y controles según valores de células NK, CD56 dim, CD56 bright, CD3+ y NKT por grupos.

Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.

Período febrero a agosto, 2016.

Variables	Pacientes	Controles	P
N	18	16	
NK (mm3)	175 ± 99	209 ± 60	0,237
NK (%)	9,5 ± 5,6	10,2 ± 1,6	0,622
Bright (mm3)	30 ± 28	68 ± 24	0,001
Bright (%)	1,6 ± 1,6	3,4 ± 1,1	0,001
Dim (mm3)	151 ± 92	144 ± 50	0,773
Dim (%)	8,1 ± 5,5	7,0 ± 1,5	0,402
NKT (mm3)	5,4 ± 7,4	1,1 ± 0,6	0,026
NKT (%)	0,34 ± 0,55	0,06 ± 0,03	0,047
CD3+ (mm3)	1416 ± 802	1402 ± 233	0,942
CD3+ (%)	65,4 ± 11,0	69,4 ± 3,4	0,165

Valores expresados como media ± desviación estándar

Tabla 6.
Distribución de pacientes con corticoesteroides y sin corticoesteroides comparado con
controles.

Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.

Período febrero a agosto, 2016.

Variables	Grupo A	Grupo B	Grupo C	P	Post-hoc (*)
N	13	5	16	-	-
NK (mm3)	141 ± 66	264 ± 120	209 ± 60	0,006	A vs B
NK (%)	7,1 ± 3,4	15,7 ± 5,6	10,2 ± 1,6	0,002	A vs B; A vs C
Bright (mm3)	22 ± 25	49 ± 27	68 ± 24	0,001	A vs C
Bright (%)	1,29 ± 1,61	2,43 ± 1,51	3,36 ± 1,09	0,001	A vs C
Dim (mm3)	126 ± 80	216 ± 97	144 ± 50	0,064	-
Dim (%)	6,1 ± 4,1	13,3 ± 5,5	7,0 ± 1,5	0,001	A vs B
NKT (mm3)	7,1 ± 8,2	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,6	0,010	A vs B; A vs C
NKT (%)	0,44 ± 0,63	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,034	A vs B; A vs C
CD3+ (mm3)	1494 ± 873	1213 ± 615	1402 ± 233	0,682	-
CD3+ (%)	65,3 ± 12,6	65,7 ± 6,5	69,4 ± 3,4	0,411	-

(*) Prueba post-hoc de Dunnett tomando como referencia grupo C con valor significativo $p < 0,05$

Grupo A: Pacientes con corticoesteroides

Grupo B: Pacientes sin corticoesteroides

Grupo C: Controles

Valores expresados como media ± desviación estándar

Tabla 7.

**Distribución de pacientes sin corticoesteroides y controles según valores de células NK,
CD56 dim, CD56 bright, CD3+ y NKT por grupos.
Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.
Período febrero a agosto, 2016.**

Variables	Pacientes sin corticoesteroides	Controles	P
N	5	16	
NK (mm3)	264 ± 120	209 ± 60	0,377
NK (%)	15,7 ± 5,6	10,2 ± 1,6	0,092
Bright (mm3)	49 ± 27	68 ± 24	0,153
Bright (%)	2,43 ± 1,51	3,4 ± 1,1	0,146
Dim (mm3)	216 ± 97	144 ± 50	0,037
Dim (%)	13,3 ± 5,5	7,0 ± 1,5	0,059
NKT (mm3)	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,6	0,966
NKT (%)	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,365
CD3+ (mm3)	1213 ± 615	1402 ± 233	0,536
CD3+ (%)	65,7 ± 6,5	69,4 ± 3,4	0,114

Valores expresados como media ± desviación estándar

Tabla 8.

**Distribución de pacientes con enfermedades ampollares autoinmunes con y sin
tratamiento con corticoesteroides sistémicos.**

Células NK en enfermedades ampollares autoinmunes.

Período febrero a agosto, 2016.

Variables	Pacientes con corticoesteroides	Pacientes sin corticoesteroides	P
N	13	5	-
NK (mm3)	141 ± 66	264 ± 120	0,013
NK (%)	7,1 ± 3,4	15,7 ± 5,6	0,001
Bright (mm3)	22 ± 25	49 ± 27	0,066
Bright (%)	1,3 ± 1,6	2,4 ± 1,5	0,187
Dim (mm3)	126 ± 80	216 ± 97	0,061
Dim (%)	6,1 ± 4,1	13,3 ± 5,5	0,007
NKT (mm3)	7,0 ± 8,2	1,1 ± 0,7	0,024
NKT (%)	0,4 ± 0,6	0,07 ± 0,04	0,056
CD3+ (mm3)	1494 ± 873	1213 ± 614	0,522
CD3+ (%)	65,3 ± 15,6	65,7 ± 6,5	0,943

Valores expresados como media ± desviación estándar