



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**  
**CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGÍA Y SIFILOGRAFÍA**  
**HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS**

**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEINA 1 Y  
ANTIDESMOGLEINA 3 EN PACIENTES VENEZOLANOS CON PÉNFIGO VULGAR  
DOMINANTE MUCOSO HLA DRB1\*0402**

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

**Roseisela García Maestre**

**Tutor: Ana María Saéñz de Cantele**

**Caracas, febrero 2013**

---

Ana María Sáenz de Cantele

TUTOR

---

Ángela E Ruiz Damaso

DIRECTOR DEL CURSO

---

Ana María Sáenz de Cantele.

COORDINADOR DEL CURSO

---

Adrina Calebotta

ASESORA

**DEDICATORIA**

A Dios, por brindarme fortaleza para seguir adelante.

A mi querido esposo, por siempre apoyarme.

A mi hija, por siempre brindarme cariño y una linda sonrisa.

A mis padres por su amor incondicional.

## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MÉTODOS	9
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	18
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXOS	24

# DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIDESMOGLEINA 1 Y ANTIDESMOGLEINA 3 EN PACIENTES VENEZOLANOS CON PÉNFIGO VULGAR DOMINANTE MUCOSO HLA DRB1\*0402

Roseisela García M. Curso de Especialización en Dermatología.

[roseiselagarcia@hotmail.com](mailto:roseiselagarcia@hotmail.com)

Ana M Sáenz. Especialista en Dermatología y Sifilografía.

[anamsaenz@gmail.com](mailto:anamsaenz@gmail.com)

## RESUMEN

Objetivo: determinar la presencia de anticuerpos (Acs) anti-desmogleína 1(anti-Dsg 1) y anti-desmogleína 3 (Dsg 3) en pacientes venezolanos con pénfigo vulgar (PV) dominante mucoso, que expresan el alelo HLA-DRB1\* 0402, con la finalidad de evaluar la existencia de asociación entre la Dsg3 y la susceptibilidad de presentar clínica mucosa altamente crónica y recalcitrante. Método: se incluyeron 07 pacientes con diagnóstico clínico, histopatológico e inmunofluorescencia directa de PV dominante mucoso, que poseían el alelo HLA clase II DRB1\*0402. Por método de ELISA se hizo la determinación Acs anti-Dsg1 y Acs anti-Dsg3. Se incluyeron un total de 38 individuos sanos, no relacionados, a quienes no se les determinó los alelos HLA clase II. Resultados: se demostró en 4 casos la presencia de ambos anticuerpos, 2 únicamente con Acs anti-Dsg3 y en uno no se determinó la presencia de anticuerpos. En los controles solo uno tuvo la presencia de ambos anticuerpos, en la mayoría no se detectaron éstos y en 4 se evidenció la presencia de Acs anti-Dsg1. Al comparar los pacientes con los controles de acuerdo a la presencia y/o ausencia de los Acs anti desmogleína 1 y 3 observamos que la presencia de Acs en pacientes con el alelo DRB1\*0402 incrementa hasta 49 veces el riesgo de desarrollar pénfigo vulgar dominante mucoso (OR: 49, IC95%: 4.1023-593.2674). No se determinó la relación de la presencia de Acs anti-Dsg 3 y la susceptibilidad de presentar PV dominante mucoso, debido al limitado número de casos. Conclusiones: la presencia de Acs anti-Dsg1+/anti-Dsg3+ en pacientes con el alelo DRB1\*0402 aumenta hasta 49 veces el riesgo de desarrollar PV dominante mucoso, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. El 57.14 % de los pacientes con PV dominante mucoso se demostró la existencia de ambos anticuerpos (anti-Dsg1 +/Anti-Dsg 3 +).En la mayoría de los individuos sanos no se evidenciaron anticuerpos.

Palabras clave: pénfigo vulgar dominante mucoso, auto-anticuerpos Dsg1 y Dsg3.

**DETERMINATION OF ANTIDESMOGLEIN 1 AND ANTIDESMOGLEIN 3  
ANTIBODIES IN VENEZUELAN PATIENTS WITH MUCOSAL DOMINANT  
PEMPHIGUS VULGARIS HLA DRB1 \* 0402**

**ABSTRACT**

Objective: determine the presence of antibodies (Abs), anti-Dsg1 and anti-Dsg3 in Venezuelan patients suffering from mucosal dominant pemphigus vulgar (PV), showing the HLA-DRB1 0402\* allele in order to evaluate the existence of an association between Dsg3 and the susceptibility of presenting high chronic clinical mucosal as well as recalcitrant. Method: 7 patients diagnosed with histopathology and direct immunofluorescence of mucosal dominant PV possessing the HLA Class II DRB1\* 0402 allele were included. The determination of anti-Dsg1 and anti-Dsg3 Abs was carried out by using the ELISA method. A total of 38 healthy individuals, not related, were included, and the alleles HLA Class II were not determined. Results: 4 cases showed the presence of both Abs, 2 only showed anti-Dsg3 Abs and in one no Abs was present. Only one of these individuals showed the presence of both Abs, in the majority, these were not detected and in 4 of them the presence of Dsg1 Abs was evidenced. By comparing both groups in accordance with the antidesmoglein 1 and 3 Abs, we observed the presence of the DRB1\* 0402 allele increases up to 49 times the risk of suffering from mucosal PV (OR: 49, IC95%: 4.1023-593.2674). The relation between the presence of anti-Dsg3 Abs and the susceptibility of presenting PV, due to the limited number of cases. Conclusions: The presence anti-Dsg1+/anti-Dsg3+ Abs in patients with DRB1 0402 allele increase 49 times the risk of suffering from mucosal dominant PV, but the difference was not statistically significant. The 57.14% of patients having mucosal dominant PV showed the existence of anti-Dsg1+/anti-Dsg3+ Abs. In most of the healthy individuals no antibodies were found.

Key words: mucosal dominant pemphigus vulgar, Dsg1 and Dsg3 auto-antibodies.

## INTRODUCCIÓN

El pénfigo pertenece a un grupo de enfermedades ampollares autoinmunes de la piel y las mucosas, se caracteriza histológicamente por la formación de ampollas intraepidérmicas secundarias a acantólisis e inmunopatológicamente por la presencia in vivo de IgG fijas y circulantes contra la superficie celular de los queratinocitos. <sup>(1-3)</sup>

En 1964 Beutner y Jordan, mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta, descubrieron estos anticuerpos (Acs) en el suero de pacientes con pénfigo vulgar (PV) y posteriormente también fueron detectados, mediante la inmunofluorescencia directa, en la piel perilesional de los pacientes afectados. <sup>(1)</sup>

El pénfigo se clasifica en dos grandes grupos: PV y pénfigo foliáceo, sin embargo, en los últimos años se han descrito tres nuevas variantes: paraneoplásico, pénfigo IgA y pénfigo herpetiforme. El pénfigo vegetante y eritematoso son variantes clínicas de los dos grupos mayores. <sup>(4-5)</sup>

La edad promedio en la cual aparece esta enfermedad es entre los 50-60 años, sin embargo, el rango de presentación es amplio y se ha descrito en la niñez. <sup>(6-7)</sup>

La incidencia mundial del pénfigo varía de 0.1 a 0.5 casos por 100.000 habitantes, pero esta enfermedad tiene una incidencia, prevalencia y características clínicas variables, de acuerdo al área geográfica donde se presente. <sup>(1, 3,6)</sup> En Venezuela la incidencia es de 0.4 por 100.000 habitantes. <sup>(6)</sup>

El PV es más frecuente en judíos Askenazi y en habitantes del mediterráneo. <sup>(1,3)</sup>

En Bamako (República de Mali) en 1996 se registraron 30 casos de pénfigo, siendo el pénfigo foliáceo (PF) el de mayor frecuencia, seguido del pénfigo vulgar (PV). <sup>(8)</sup>

Un estudio realizado en Italia (Sicilia 1998), describe 84 casos de pénfigo entre enero de 1982 y junio de 1996, siendo el PV la forma más común de presentación. <sup>(9)</sup>

Entre los años 1993 y 2001, en Corea, se describieron 51 casos de pénfigo, donde el PV fue el tipo clínico más común, seguido del PF. <sup>(10)</sup>

En Venezuela en el año 2005, se realizó un estudio epidemiológico en la consulta de Pénfigo, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Caracas (H.U.C.), abarcando 23 años de funcionamiento de dicha consulta, centro de referencia nacional, observándose que de 145 diagnosticados por clínica ,histología e inmunofluorescencia 99 casos (68.27%), correspondían a PV y 29 (20 %) a PF. (Tabla 1) <sup>(11)</sup>

Tabla N° 1

Epidemiología del pénfigo en el H.U.C año 1982 al 2005

Tipos clínicos .Servicio de Dermatología

Tipos clínicos	N° de casos	%
PV	99	68.27
PF	29	20
PE	7	4.83
P veg.	4	2.78
Fogo selvagem	2	1.38
PH	2	1.38
PP	1	0.68
No clasificado	1	0.68
Total	145	100

Fuente: historias médicas

\* PP : pénfigo paraneoplásico

En la tabla 2 se observa que de los 99 casos de PV reportados, 7 (7.07%), correspondían a los casos clínicos dominantes mucosos. Además, por cada 14.14

pacientes con PV se describe un caso de la forma clínica dominante mucoso, evidenciándose la baja incidencia de esta enfermedad. <sup>(11)</sup>

Tabla N° 2

Epidemiología del pénfigo en el H.U.C año 1982 al 2005

Tipos clínicos del PV

Servicio de Dermatología

Tipos clínicos	N° de casos	%
Predominante mucoso	7	7.07
Cutáneo- mucoso	92	92.93
Total	99	100

Fuente: historias médicas

Según su presentación clínica el PV se clasifica en mucoso o dominante mucoso, cutáneo y muco-cutáneo. Se llama dominante mucoso cuando tiene erosiones mucosas con mínimo compromiso cutáneo. <sup>(12-14)</sup>

La enfermedad predominantemente mucosa suele comenzar en la mucosa bucal en un 60 a 70 % de los pacientes <sup>(15)</sup> y permanece limitado a ésta, durante un promedio de 5 meses, antes de que las lesiones se desarrollen en la piel. <sup>(4)</sup> Las ampollas cutáneas se caracterizan por ser flácidas y se presentan en cualquier parte de la superficie cutánea. En cuanto a las mucosas la más afectada es la oral, donde se observa, erosiones dolorosas, bien delimitadas en la boca, además pueden extenderse hasta faringe y laringe asociándose disfonía. <sup>(16)</sup> Asimismo, otras mucosas pueden estar afectadas, como la conjuntiva, el ano, el pene, la vagina y la vulva. <sup>(1,4)</sup>

En el PV la acantólisis producida a nivel de los queratinocitos suprabasales, se desencadena principalmente por la acción de auto-anticuerpos tipo IgG, dirigidos contra glicoproteínas presentes en la superficie de estas células, principalmente la

desmogleína 3 (Dsg3), aunque la desmogleína 1 (Dsg1), participa también a menor escala. La interacción de los Acs anti-Dsg con sus antígenos blancos, es lo que ocasiona la pérdida de adhesión celular (acantolisis) desencadenando la formación de ampollas intra-epiteliales en la piel y en membranas mucosas. <sup>(17- 20)</sup>

Ambas son glucoproteínas que forman parte de las uniones de anclaje intercelular, llamados desmosomas, las cuales están presentes en los epitelios planos estratificados, como los de la piel y las mucosas. Estos epitelios se sustentan sobre la membrana basal y la adhesión intercelular se debe a la presencia de estructuras especializadas, que forman parte de estas uniones intercelulares. Estructuralmente los desmosomas están formados por moléculas intracelulares y transmembrana organizadas de tal manera que con un extremo fijan filamentos del citoesqueleto a la membrana plasmática celular y con el otro fijan esta membrana a estructuras extracelulares, es decir, están formados por dos placas, una interna cuyo componente principal son las plaquinas, desmoplaquina I y II y otra externa constituida por las proteínas placoglobina y placofilina, que dejan un espacio transmembrana en el que se localizan las cadherinas desmogleínas y desmocolinas. Estas glucoproteínas transmembranas de las familias de las cadherinas confieren las propiedades de adherencia a la superficie externa o al núcleo de los desmosomas. <sup>(2,21)</sup>

La Dsg1 predomina en las capas superficiales de la epidermis de localización sub-córnea, mientras que la Dsg3 predomina en las capas profundas de la epidermis, localizándose por encima de la membrana basal de la piel. <sup>(1)</sup>

La Dsg1 está presente en la cavidad oral, pero los pacientes con auto-anticuerpos dirigidos contra ésta, nunca desarrollan lesiones orales dadas la presencia de Dsg3 en dicha zona, la cual es capaz de mantener las células unidas. Al estar afectadas ambas glicoproteínas se observan lesiones orales. Los auto-anticuerpos anti- Dsg1 inactivan la función de la Dsg1 en la dermis profunda y membrana mucosa, sin embargo, como la Dsg3 también se co-expresa en dichas regiones no se forma la ampolla. Confirmando que la compensación en la adhesión

puede ocurrir, lo que plantea que las Dsg pueden tener otra función diferente a la de mantener la unión celular. <sup>(22)</sup>

Hasta la actualidad no ha sido reconocida la causa de la pérdida de tolerancia inmunológica hacia estos auto-antígenos (Dsg1 y Dsg3), sin embargo, se ha determinado que la enfermedad se asocia a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) que por su estructura favorecen la unión de ciertos péptidos de las desmogleínas. <sup>(2)</sup>

Desde 1980, fue demostrada la asociación del PV con los alelos HLA clase II, genes altamente polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie de una variedad de células. Estos genes se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 ocupando un gran segmento del ADN (6p21.3). En el PV, se destacan dos haplotipos, los cuales fueron consistentemente asociados con esta patología, DR4 y DR14, más específicamente con los subtipos DRB1\*0402 (DR4) y DRB1\* 1401 (DR14). <sup>(17)</sup>

En poblaciones judías hay asociación entre PV y los alelos HLA DRB1\* 0402, mientras que en las poblaciones no judías la asociación es con los alelos HLA-DQB1\*0503, principalmente. <sup>(2)</sup>

En el año 2007, Sáenz et al, publicaron un trabajo en el cual demostraron que el DRB1\* 0402 sin DQB1\*0302, es el alelo HLA- DRB1\* más relevante y mayormente implicado en la patogénesis del PV en pacientes venezolanos. <sup>(23)</sup>

Los alelos que codifican para moléculas HLA clase II se han implicado en la presentación de epítomos de Dsg3 a los linfocitos T auto-reactivos, porque tienen una carga negativa en un sitio crítico de unión al antígeno que es ocupado por una carga positiva de algunos residuos de la Dsg3. Es por ello que tener alguno de estos haplotipos incrementa el riesgo de padecer la enfermedad cerca de 14 veces. <sup>(2)</sup>

Personas genéticamente susceptibles tienen mayor riesgo de desarrollar PV al estar expuestas a fármacos con un grupo tiol en su estructura, como la D-penicilamina y el captopril, o bien con un grupo amida activo como el enalapril, la penicilina, las cefalosporinas y la rifampicina. <sup>(1-2)</sup>

El diagnóstico de PV se basa en la clínica, histopatología e inmunofluorescencia directa o indirecta. Recientemente se ha utilizado la determinación de los autoanticuerpos por la técnica ELISA, método a través del cual es posible determinar Acs contra Dsg, al detectar los antígenos contra los que van dirigidos éstos. Su sensibilidad y especificidad se encuentra entre el 85-96 %.<sup>(12)</sup>

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de Acs anti-Dsg1 y anti-Dsg3 en pacientes venezolanos con pénfigo vulgar dominante mucoso, que expresan el alelo HLA-DRB1\* 0402, con la finalidad de evaluar la existencia de asociación entre la Dsg3 y la susceptibilidad de presentar clínica mucosa altamente crónica y recalcitrante. Asimismo, comparar la frecuencia de Acs anti-Dsg1 y anti-Dsg3 entre pacientes con pénfigo vulgar dominante mucoso e individuos sanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la presencia de anticuerpos anti-Dsg1 en suero de pacientes con PV dominante mucoso e individuos sanos.
2. Determinar la presencia de anticuerpos anti-Dsg3 en suero de pacientes con PV dominante mucoso e individuos sanos.
3. Comparar entre pacientes con pénfigo vulgar dominante mucoso e individuos sanos la presencia de anticuerpos anti-Dsg1 y anticuerpos anti-Dsg3.
4. Evaluar la posible asociación entre la Dsg3 y la susceptibilidad de padecer forma clínica de PV dominante mucoso recalcitrante.

## **MÉTODO**

Se realizó un estudio descriptivo, correlacional y de corte transversal. Se incluyeron 07 pacientes con diagnóstico clínico, histopatológico e inmunofluorescencia directa de pénfigo vulgar dominante mucoso, que poseían el alelo HLA clase II DRB1\*0402. Estos pacientes fueron evaluados en la consulta de enfermedades ampollares del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas (centro de referencia nacional). Definiéndose el pénfigo vulgar dominante mucoso como la presencia de erosiones mucosas con mínimo compromiso cutáneo.  
(14)

Todos los individuos participantes firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de Bioética del Servicio de Dermatología del H.U.C.

Los datos se recolectaron en ficha, donde se registró nombre, edad, sexo, ubicación topográfica de la lesión inicial, grado de severidad, tiempo de progresión de las lesiones de mucosa a piel, presencia de anticuerpos anti-Dsg 1 y anti-Dsg3.

El grado de severidad se determinó según el número de áreas anatómicas afectadas en la primera consulta (1-2 leve, 3-4 moderada, > 4 grave), esta clasificación se toma de un consenso llevado entre los médicos que atienden dicha consulta en el centro de estudio basado en la revisión de la literatura. Es conveniente resaltar, que la severidad del PV dominante mucoso, puede ser dada solo por la afección total de una mucosa que tenga como consecuencia limitación importante de funciones vitales para el individuo.

Se incluyeron un total de 38 individuos sanos, no relacionados, a quienes no se les determinó los alelos HLA clase II, sólo los anticuerpos anti-Dsg1 y anticuerpos anti-Dsg3.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Pacientes con diagnóstico clínico, histopatológico e inmunofluorescencia directa de pénfigo vulgar dominante mucoso y expresión del alelo HLA DRB1\*0402.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

1. Individuos con otras enfermedades ampollares: penfigoide ampollar, penfigoide cictrizal, epidermolisis ampollar adquirida, dermatitis herpetiforme, herpes gestationis, eritema polimorfo, impétigo ampollar, dermatosis por IgA lineal, dermatosis acantolítica transitoria y dermatosis pustular subcórnea, diagnósticos excluidos por biopsia e inmunofluorescencia.
2. Individuos con otras enfermedades de origen autoinmune o alérgico, como artritis reumatoide, lupus eritematoso y dermatitis atópica, excluidas por clínica y laboratorio.
3. Familiares directos de los pacientes con pénfigo (abuelos, padres, hermanos e hijos), referidos en la historia clínica.

### **Técnica de recolección de muestras para determinación de niveles de anti-desmogleína 1 y 3:**

De cada paciente se obtuvo 20 cc de sangre venosa, la cual posterior a la formación de coágulo a temperatura ambiente se procedió a la separación del suero, centrifugado la muestra a la 3.000 r.p.m durante 15 minutos. Se almacenó a temperatura de -70 °C.

### **Detección de anticuerpos anti-desmogleína 1 y 3 mediante método de ELISA semi-cuantitativo:**

Por método de ELISA se determinó la presencia de auto-anticuerpos Dsg-1 y Dsg-3 en el suero de 07 pacientes con pénfigo vulgar dominante mucoso y 38 individuos sanos.

Las muestras se procesaron en la Sección Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, IVIC, con un estuche de ELISA comercial, distribuido por la empresa RhiGene Inc. (USA), cuyo antígeno esta inmovilizado en la fase sólida y está conformado por proteínas recombinantes purificadas.

Se extraen las alícuotas de suero del congelador permitiendo que alcancen la temperatura ambiente. Se agrega a cada pozo, cubierto con los antígenos de desmogleína 1 ó 3, la cantidad de 100 microlitros de una dilución de 1:101 del suero de cada paciente, esta dilución se obtuvo utilizando 10 microlitros de suero y 1 cc del diluyente de la muestra (Tris-HCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, suero bovino y azida de sodio a pH de 7,4). Aparte se agregan directamente, a los pozos correspondientes, la cantidad de 10 microlitros de los calibradores para desmogleína 1 y 3 (suero humano positivo para anticuerpos antidesmogleína 1 o antidesmogleína 3 con Tris-HCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, suero bovino y azida de sodio). Se cubren los pozos y se incuban a temperatura ambiente (20-25°C) por 60 minutos, permitiendo así que los anticuerpos reaccionen con los antígenos inmovilizados formando complejos antígeno-anticuerpos estables.

Luego de la incubación, se descarta todo el contenido de los pozos y se lavan los mismos con buffer de lavado para remover cualquier proteína no adherida, en una dilución 1:10, obtenida a partir de un concentrado de buffer de lavado 10 X con agua destilada.

Posterior al lavado se agrega a cada pozo 100 microlitros de una dilución 1:10 del conjugado concentrado, el cual ha sido previamente diluido con 10 cc del diluyente de conjugado. La finalidad de este paso es la unión del conjugado a los complejos antígeno-anticuerpo formados con anterioridad y para lo cual se incuba por 60 minutos a una temperatura ambiente de (20-25 °C)

Luego se procede a otro lavado siguiendo los pasos antes descritos, se agregan a cada pozo 100 microlitros de la solución de sustrato de la peroxidasa y se incuban por 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se agregan a cada pozo 100 microlitros de la sustancia neutralizadora con la finalidad de terminar la reacción enzimática y estabilizar el desarrollo del color. De inmediato se procede a la lectura de las muestras con el uso de un multi-lector para ELISA (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) a una longitud de onda de 450 nm. La calibración de los resultados se realizó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidad de valor (U/ml)} = (\text{DO Muestra} - 0.10) / (0.70 - 0.10) \text{ por } 100$$

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de las diferencias entre el grupo de pacientes y controles fue estimada por la prueba exacta de Fisher usando las tablas de contingencia 2x2. Los valores de (p) se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) y se consideraron significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ . Para estimar el riesgo, el Odds Ratio (OR) con el correspondiente intervalo de confianza (95%) se determinó con la fórmula de Woolf (Woolf, B 1955) y en los casos que las celdas presentaron valores iguales a cero se aplicó la fórmula modificada de Haldane (Haldane, J 1956)

$$\text{OR} = \frac{\text{Odds de exposición en casos}}{\text{Odds de exposición en controles}} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{ad}{bc}$$

$$\text{Odds de exposición en casos} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{Odds de exposición en controles} = \frac{c}{c+d}$$

## RESULTADOS

Una vez determinada la presencia de Acs anti Dsg1 y anti-Dsg3, se agruparon los pacientes con pénfigo vulgar dominante mucoso y los controles en cuatro grupos:

Grupo 1: Acs anti-Dsg1 +/-anti-Dsg 3+

Grupo 2: Acs anti-Dsg1 +/-anti-Dsg 3-

Grupo 3: Acs anti-Dsg1 -/anti-Dsg 3+

Grupo 4: Acs anti-Dsg1 -/anti-Dsg 3-

Observándose en los pacientes lo siguiente:

De los siete pacientes, seis corresponden al sexo femenino. En cuatro de ellos, las lesiones iniciales se ubicaron en la mucosa y tres en piel. Cinco casos se manifestaron inicialmente como moderados, uno leve y otro grave.

En cuatro pacientes de esta muestra el intervalo de aparición de las lesiones en otra área corporal fue menor a seis, sólo uno tuvo un período de aparición mayor a los seis meses, y en dos pacientes se comprometieron ambas regiones.

En 4 casos la presencia de ambos anticuerpos, 2 únicamente con Acs anti-Dsg3 y en uno no se determinó la presencia de anticuerpos. En los controles solo uno tuvo la presencia de ambos anticuerpos, en la mayoría (n=33) no se detectaron éstos y en 4 se evidenció la presencia de Acs anti-Dsg1 (Tabla 3). Al control con ambos anticuerpos se le tipificó el HLA-DRB1, presentando los alelos HLA clase II, DRB1\*15-DRB1\*15. Al comparar los pacientes con los controles de acuerdo a la presencia y/o ausencia de los anticuerpos anti desmogleína 1 y 3 observamos que la presencia de Acs anti-Dsg en pacientes con el alelo DRB1\*0402 aumenta hasta 49 veces el riesgo de desarrollar pénfigo vulgar dominante mucoso (OR: 49, IC95%: 4.1-593.2), aunque la diferencia no fue significativa.

Tabla N° 3

Determinación de anti-Dsg en controles sanos y  
pacientes con PV dominante mucoso, HLA DRB1\*0402

Servicio de Dermatología. H.U.C

Acs anti-Dsg	N° de casos	Controles
Anti-Dsg 1 +/Anti-Dsg 3+	4	1
Anti-Dsg 1 +/Anti-Dsg 3-	0	4
Anti-Dsg 1 -/Anti-Dsg 3+	2	0
Anti-Dsg 1 -/Anti-Dsg 3-	1	33

Fuente:IVIC

Posteriormente, considerando la severidad de la enfermedad, observamos en los pacientes con un grado de severidad moderado la presencia de Acs anti-Dsg1 +/Anti-Dsg 3+ (3/5), Acs anti-Dsg3 (1/5) y la ausencia de los dos anticuerpos (1/5). En el único caso con presentación clínica severa se observó la presencia de ambos anticuerpos (Dsg1+/Dsg 3+), mientras que en el único caso leve se evidenció solo los Acs anti-Dsg3 (Tabla 4).

No se determinó la relación de la presencia de Acs anti-Dsg 3 y la susceptibilidad de presentar PV dominante mucoso, debido al limitado número de casos.

Tabla N°4

Pacientes con PV dominante mucoso, HLA DRB1\*0402

Relación entre grado de severidad y Acs anti-Dsg presentes.

Servicio de Dermatología. H.U.C

Pacientes	Grado de severidad		
	Leve	Moderado	Severo
Anti-Dsg 1 +/Anti-Dsg 3+		3	1
Anti-Dsg 1 +/Anti-Dsg 3-			
Anti-Dsg 1 -/Anti-Dsg 3+	1	1	
Anti-Dsg 1 -/Anti-Dsg 3-		1	

Fuente: historias médicas/ IVIC

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró, al comparar a los pacientes con los controles, que la presencia de Acs anti-Dsg1+/anti-Dsg3+ en pacientes con el alelo DRB1\*0402 incrementa hasta 49 veces el riesgo de desarrollar PV dominante mucoso.

No existen reportes en la literatura donde se haya evaluado lo anteriormente descrito.

En poblaciones judías hay asociación entre el PV y los alelos HLA -DRB1\*0402, mientras que en poblaciones no judías la asociación predominante es con los alelos HLA-DQB1 \*0503 principalmente. <sup>(2, 24-25)</sup>

De los siete pacientes venezolanos con PV dominante mucoso que expresan alelos HLA-DRB1 \*0402, cuatro casos presentaron la presencia de ambos auto-anticuerpos (Dsg1+/anti-Dsg3+), dos únicamente Acs anti-Dsg 3 y en uno no se determinó la presencia de auto-anticuerpos, este último resultado podría deberse a que la sensibilidad de la prueba de Elisa es del 80-90 %, entre un 10-20 % de los casos pueden reportar falsos negativos. <sup>(4,28)</sup>

Harman KE et al, evidenciaron en su trabajo, que los pacientes con PV presentaban auto-anticuerpos anti-Dsg3+, y de éstos el 61 % presentaba, además, auto-anticuerpos anti-Dsg1 +, estos casos correspondían al tipo clínico cutáneo-mucoso. <sup>(26)</sup>

Amagai et al, evidenciaron que en la totalidad de sus pacientes con PV dominante mucoso, tenían anticuerpos anti-Dsg1-/anti-Dsg3+, mientras que los pacientes con la forma clínica cutáneo mucosa tuvieron presente ambos anticuerpos. <sup>(14)</sup>

Zagrodniuk et al, afirman que el perfil de auto-anticuerpos anti-Dsg, no es predictivo para los subtipos clínicos del pénfigo vulgar. <sup>(27)</sup> Sharma et al, sustenta este mismo hallazgo en su trabajo. <sup>(12)</sup>

Aunque, en general, el fenotipo clínico está relacionado con el perfil de anticuerpos, existen casos con fenotipo y perfil de anticuerpos discordantes. Tales discrepancias

pueden ser explicadas por variaciones genéticas o la presencia de antígenos menores involucrados en la patogénesis del pénfigo <sup>(28)</sup>

Se han descrito otros autoantígenos en PV como el receptor de acetilcolina alfa 9, la penfaxina, ubicada en la superficie del queratinocito y la desmoplaquina, que también pueden generar la producción de autoanticuerpos, participando en la patogenia de la enfermedad. <sup>(2)</sup>

Posteriormente, considerando la severidad de la enfermedad, observamos en los pacientes con un grado de severidad moderado la presencia de Acs anti-Dsg1 +/-Anti-Dsg 3+ (3/5), Acs anti-Dsg3 (1/5) y la ausencia de los dos anticuerpos (1/5). En el único caso con presentación clínica severa se observó la presencia de ambos anticuerpos (Dsg1+/Dsg 3+), mientras que en el único caso leve se evidenció solo los Acs anti-Dsg3 (Tabla 4).

No se determinó la relación de la presencia de Acs anti-Dsg 3 y la susceptibilidad de presentar PV dominante mucoso, debido al limitado número de casos.

Harman KE et al, demostró en dos trabajos publicados (años 2000 y 2003) asociación entre la presencia de auto-anticuerpos anti-Dsg1 y mayor grado de severidad de las lesiones orales. <sup>(26,29)</sup>, esta misma relación fue observada por Sharma et al. <sup>(12)</sup>

En los individuos sanos (n=38), en 33 no se evidenciaron anticuerpos, solo cuatro tuvieron positividad para auto-anticuerpos anti-Dsg1 y un solo control tuvo positividad para ambos anticuerpos (anti-Dsg3+/anti-Dsg1+).

Kawasaki H et al, indican como resultado de un estudio experimental, que la sola presencia de los anticuerpos anti-Dsg3, tipo IgG, no es suficiente para la formación de la ampolla en un ratón adulto. <sup>(20)</sup>

Se requiere la intervención de eventos desencadenantes sumado a la predisposición genética para que se produzca la enfermedad. <sup>(4)</sup>

Finalmente el PV, como otras enfermedades autoinmunes, es un desorden complejo y poligénico, donde muchos genes con penetrancia y expresividad variable operan e interactúan para controlar el proceso de la enfermedad.<sup>(17)</sup>

## **CONCLUSIONES**

La presencia de Acs anti-Dsg1+/anti-Dsg3+ en pacientes con el alelo DRB1\*0402 aumenta hasta 49 veces el riesgo de desarrollar PV dominante mucoso, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

El 57.14 % de los pacientes con PV dominante mucoso se demostró la existencia de ambos anticuerpos (anti-Dsg1 +/Anti-Dsg 3 +).

En la mayoría de los individuos sanos no se evidenciaron anticuerpos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Sección de Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, IVIC, agradezco a la Dra. Mercedes Fernández y a la Licenciada Violeta Ogando, por el gran apoyo brindado en el desarrollo del presente proyecto.

A los pacientes por su disposición a colaborar en la realización de este estudio

## REFERENCIAS

1. Stanley J.Pemphigus.In: Wolff K,Goldsmith L,Katz S,Gilchrest B,Paller A , Leffell D,editors.Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.7 edition. New York:Mc Graw Hill, Medical;2008.p459-468.
2. Chiapa M,Becker I. Pénfigo vulgar: una revisión de la inmunopatología. Bioquimia 2007; 32: 100-108.
3. Glorio RR, Rodríguez G, Haas R,Larriba J, Fainboim L, Woscoff A.Determinación por PCR de la asociación entre antígenos HLA clase II y pénfigo vulgar. Medicina 1999; 59: 28-32.
4. Castellanos AA, Guevara E. Pénfigo vulgar.Dermatología Rev Mex 2011; 55: 74-83.
5. Calebotta A, Sáenz AM, DiFrancescantonio AR, Cirocco A,Rodríguez MA.Pénfigo: tratamiento con altas dosis de inmunoglobulina intravenosa en una serie de 12 pacientes del Hospital universitario de Caracas. Reporte preliminar.Dermatología Venezolana 2001;39 :99-103.
6. Calebotta A, Cirocco A,Rodríguez MA, Sáenz AM. Pénfigo vulgar oral precediendo lesiones cutáneas. Dermatología Venezolana 2002; 40:6-10.
7. Vega ME, Sáez MM, Cortés R,Dominguez L,Granados J. Análisis del HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo.Gac Méd Méx 2001;137:535-540
8. Mahe A, Flageul B,Cisse I,Keita S,Bobin P.Pemphigus in Mali:a study of 30 cases. Br J Dermatol 1996; 134:114-9

9. Micali G, Musumeci M, Nasca M. Epidemiologic analysis and course of 84 consecutive cases of pemphigus in eastern Sicily. *Int J Dermatol* 1998; 37:197-200
10. Seo P, Choi W, Chung J. Pemphigus in Korea: clinical manifestations and treatment protocol. *J Dermatol* 2003;30:782-8
11. García R, Marcano M, Martín R, Sáenz A, Calebotta A. Epidemiología del Pénfigo en el H.U.C: Estudio retrospectivo de 145 casos en 3 años (1982-2005). Trabajo libre presentado en la XLI Reunión Anual e la Sociedad Venezolana de Dermatología y Cirugía Dermatológica; 2005 Oct, Caracas.
12. Sharma VK, Prasad HR, Khandpur S, Kumar A. Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 2006; 45: 518-22.
13. Yoshida K, Takae Y, Saito H, Oka H, Tanikawa A, Amagai M et al. Cutaneous type pemphigus vulgaris: a rare clinical phenotype of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52:839-45.
14. Amagai M, Tsunoda K, Zilikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:167-70.
15. Jiménez Y, Díaz JM. Enfermedades ampollares en la cavidad oral: pénfigo. *RCOE* 2004; 9:439-447.
16. Danczak A, Pazdrowski J, Bowszyc M, Dmochowski M. Laryngeal lesions in mucosal dominant subtype of pemphigus vulgaris. *Otolaryngol Pol* 2007; 61:509-12.
17. Tron F, Gilbert D, Mouquet H, Joly P, Drouot L, Makni S et al. Genetic factors in pemphigus. *J Autoimmun* 2005; 24:319-28.

18. Gliem M, Heupel WM, Spindler V, Harms GS, Waschke J. Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C606-13.
19. Nagel A, Lang A, Engel D, Podstawa E, Hunzelmann N, de Pita O et al. Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2010; 134:320-30.
20. Kawasaki h, Tsunoda k, Hata T, Ishii K, Yamada T, Amagai M. Synergistic pathogenic effects of combined mouse monoclonal anti-desmoglein 3 IgG antibodies on pemphigus vulgaris blister formation. *J Invest Dermatol* 2006; 126:2621-2630.
21. Cirillo N, Lanza M, De Rosa A, Femiano F, Gombos F, Lanza A. At least three phosphorylation events induced by pemphigus vulgaris sera are pathogenically involved in keratinocyte acantholysis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21:189-95.
22. Hanakawa Y, Matsuyoshi N, Stanley J. Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion. *J Invest Dermatol* 2002; 119:27-31.
23. Sáenz AM, Fernández M, Montagnani S, Calebotta A, Balbas O, Layrisse Z. HLA-DRB1\* 0402 haplotypes without DQB1\*0302 in Venezuelan patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 2007; 69: 318-25.
24. Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S et al. *J Autoimmun* 2000; 15:67-73.
25. Birol A, Anadolu RY, Tutkak H, Gurgey E. HLA-Class 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. *Int J Dermatol* 2002; 41:79-83.
26. Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. A Study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype. *Br J Dermatol* 2000; 43:343-8.

27. Zagorodniuk I, Weltfriend S, Shtruminger L, Sprecher E, Kogan O, Pollack S et al. A comparison of anti-desmoglein antibodies and indirect immunofluorescence in the serodiagnosis of pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 2005; 44:541-4.

28. Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, Mansoori P, Taheri A, Firooz A et al. Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21:1319-24.

29. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001; 144:775-80.

# ANEXOS



## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Ubicación topográfica de la lesión inicial:

\_\_\_\_\_

Grado de severidad: \_\_\_\_\_

Tiempo de progresión de las lesiones de mucosa a piel:

\_\_\_\_\_

Anticuerpos anti-desmogleína

Grupo 1: Acs anti-Dsg1 +/-anti-Dsg 3+

Pacientes:

Controles

Grupo 2: Acs anti-Dsg1 +/-anti-Dsg 3-

Pacientes:

Controles:

Grupo 3: Acs anti-Dsg1 -/anti-Dsg 3+

Pacientes:

Controles:

Grupo 4: Acs anti-Dsg1 -/anti-Dsg 3-

Pacientes:

Controles:

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN (GRUPO EN ESTUDIO).**

TITULO: Determinación de anticuerpos antidesmogleina 1 y antidesmogleina 3 en pacientes venezolanos con pénfigo vulgar dominante mucoso HLA DRB1\*0402

Investigador Principal: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_  
Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Ud. ha sido convocado a participar en un estudio relacionado con los problemas de salud que está presentando, la enfermedad del Pénfigo vulgar dominante mucoso. En este consentimiento se le informa por qué se está realizando este estudio y qué se le hará si decide participar en el mismo.

*Propósito de este estudio:*

El Pénfigo es una enfermedad autoinmune, lo que significa que el sistema inmunológico de manera anormal daña las células de la piel y mucosas produciendo lesiones con todas las consecuencias. El pénfigo vulgar dominante mucoso ocasiona limitaciones importantes en el paciente asociadas principalmente a su alimentación. Las investigadoras Doctoras: Ana M Sáenz, Adriana Calebotta y Roseisela García, médicos del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas, estudiarán la asociación en pacientes con pénfigo vulgar dominante mucoso HLA DRB1\*0402 con el anticuerpo antidesmogleína 3. El objetivo de esta investigación es *determinar la susceptibilidad de presentar esta forma clínica altamente crónica y recidivante.*

Sus derechos: Es importante que usted sepa:

1. Su participación es completamente voluntaria.
2. Ud. puede decidir si participa o no, o retirarse de la investigación sin perjuicio para Ud.
3. Ud. será informado de cualquier cambio o nueva información que ocurriese durante el estudio y que pueda afectar su participación.

*Como puede ser incluido en el estudio:*

Lo primero es identificar si Ud. califica para el estudio.

1. Pacientes con diagnóstico de pénfigo vulgar dominante mucoso HLA DRB1\*0402
2. Individuos controles sanos

*Procedimientos*

Su participación consiste en la donación voluntaria de una pequeña muestra de sangre (20 cc) en dos (2) oportunidades.

*Riesgo de la toma de muestra*

La extracción de sangre causa muy pocas molestias. Las personas nerviosas sienten a veces que se marean, o les duele; otras veces puede quedar un pequeño morado en el sitio de la toma que desaparece en pocos días. La cantidad de sangre que se tomará en este estudio es relativamente pequeña y por lo tanto no conduce a anemia, ni a ningún otro trastorno de salud. Sin embargo, en caso de alguna complicación relacionada a este procedimiento Ud. recibirá atención médica apropiada en este centro.

Beneficios. Ud. se puede beneficiar con su participación porque:

1. Se le realizarán exámenes inmunológicos que consisten en la medición de anticuerpos los cuales podrían ser de utilidad a su médico tratante para seguir la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Además, en caso de encontrar cualquier anomalía durante el procesamiento u obtención de los resultados de sus muestras sanguíneas, se le notificará inmediatamente a su médico tratante.

*Costo:*

No hay ningún costo adicional para Ud. por participar en este estudio.

*Alternativas:*

Si Ud no desea participar recibirá de todas formas el tratamiento adecuado en este Centro.

*Confidencialidad*

Su historia clínica será confidencial y se identificará en el estudio con un número y solo los médicos e investigadores sabrán a que nombre corresponde. Su nombre no será usado en ninguna publicación o reporte

*Retiro del estudio:*

Puede retirarse del estudio cuando lo desee. Si el médico que lo está atendiendo considera que su participación durante el estudio no es favorable para Ud. puede decidir que debe abandonar el estudio.

*Uso de muestras:*

Se realizará la determinación de anticuerpos dirigidos contra estructuras de sus células epidérmicas por método llamado ELISA.

Si Ud. no desea que se guarden muestras de sangre extra, también puede participar en el estudio

\_\_\_\_Yo autorizo a que guarden muestras de sangre para futuras investigaciones.

\_\_\_\_Yo no autorizo guarden muestras de sangre para futuras investigaciones.

Iniciales \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Las futuras investigaciones utilizando sus muestras de sangre extra deberán ser aprobadas también por el Comité de Ética de las instituciones participantes en el estudio, este Comité tiene como misión proteger sus derechos como paciente.

Si en cualquier momento quiere Ud. desautorizar los estudios con sus muestras de sangre guardadas, comuníquese con los investigadores y manifiésteles su decisión. Entonces sus muestras no estarán disponibles para investigaciones.

Si Ud. autoriza el uso de sus muestras (la sangre extra para futuras investigaciones, los investigadores que estudien sus muestras pudieran querer saber más sobre Ud. Si los investigadores necesitan otra información sobre Ud

(Por favor marque abajo para indicar si Ud. puede o no ser contactado en el futuro)

- \_\_\_\_\_ Puede ser contactado de nuevo para información
- \_\_\_\_\_ No puedo ser contactado de nuevo para información

Iniciales del voluntario \_\_\_\_\_ Fecha

Si Ud está de acuerdo en ser contactado de nuevo, aún después puede cambiar de opinión en proveer información en el futuro.

El propósito procedimientos de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien, he sido informado acerca de todas las incomodidades, riesgos y beneficios que pueden resultar y los he comprendido. He sido informado de que puedan ocurrir eventos inesperados. Yo estoy de acuerdo en participar como individuo en este proyecto. Yo estoy enterado de que puedo suspender mi participación en cualquier momento

Firma del paciente \_\_\_\_\_ Fecha

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha

Nombre

Firma del testigo

Fecha: \_\_\_\_\_

Declaración del investigador  
Yo le he explicado a la persona arriba nombrada la naturaleza y objetivos de los procedimientos arriba descritos y los previos riesgos, las incomodidades y los beneficios que puedan resultar Le he preguntado si tenía alguna pregunta sobre los procedimientos y he contestado esas preguntas con mi mayor capacidad. He considerado y rechazado procedimientos alternativos de respuestas a las preguntas sobre esta investigación

Firma \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

