INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

SEDE: I.N.E.R.

Análisis preliminar de los niveles de Interleucina 18 como Posible marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar.

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO

DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

P R E S E N T A :

Andrés Tirado Sánchez

ASESORES

Dr. Juan Gerardo Reyes García

Dr. Francisco Javier Flores Murrieta

AGOSTO 2009

INDICE

Resumen/Abstract ---------- 1

Relación de figuras y tablas ---------- 3

Marco teórico ---------- 4

Planteamiento del problema ---------- 23

Justificación ---------- 23

Objetivos ---------- 24

Hipótesis ---------- 24

Diseño del estudio ---------- 24

Material y métodos ---------- 24

Plan de análisis ---------- 25

Aspectos éticos ---------- 31

Resultados ---------- 32

Discusión ---------- 40

Conclusiones ---------- 43

Referencias ---------- 44

Anexo 1 ---------- 52

Anexo 2 ---------- 55

Anexo 3 ---------- 56

SIP-14

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 11:00 horas del día 17 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

"Análisis Preliminar de los Niveles de Interleucina 18 como Posible Marcador y Predictor de Daño Epidérmico en Pacientes con Pénfigo Vulgar".

Presentada por el alumno:

Tirado	Sánchez	Andrés
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: B 0 5 1 1 7 0

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron ***APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS***, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dr. Juan Gerardo Reyes García

Director de Tesis

Dr. Francisco Javier Flores Murrieta

Dra. Miriam del Carmen Carrasco Portugal

Dra. Myrna Déciga Campos

Dr. Juan Rodríguez Silvero

Dr. Carlos Castillo Henkel

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 17 del mes Noviembre del año 2009, el que suscribe Andrés Tirado Sánchez alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Investigación Clínica con número de registro B051170, adscrito a La Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Juan Gerardo Reyes García, Dr. Francisco Javier Flores Murrieta y cede los derechos del trabajo intitulado **"Análisis Preliminar de los Niveles de Interleucina 18 como Marcador y Predictor de Daño Epidérmico en Pacientes con Pénfigo Vulgar"**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección atsdermahgm@gmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Andrés Tirado Sánchez

Nombre y firma

Resumen.

Introducción. El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad ampollosa crónica de la piel y mucosas de curso incierto, principalmente relacionado a la respuesta a los esteroides sistémicos, el principal tratamiento, y que puede ocasionar una mortalidad de hasta un 15 a 20% en países que no cuentan con instalaciones adecuadas para el manejo de la enfermedad. La interleucina 18 (IL-18) es una citocina aparentemente involucrada en la patogenia del pénfigo vulgar al momento de intervenir en el proceso apoptosis (que es una causa de acantolisis), y a la formación de autoanticuerpos (que también inducen acantolisis). Proponemos el uso de la IL-18 como marcador y predictor de severidad mucocutánea en el PV.

Objetivo. Evaluar el potencial de los niveles plasmáticos de Interleucina 18 como marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar.

Metodología. Estudio observacional, analítico, prospectivo, longitudinal. Se determinó la concentración plasmática de IL-18 por medio de ELISA. Los resultados se correlacionaron con la severidad de la enfermedad mediante una prueba de correlación de Pearson.

Resultados. Se analizó el plasma de 33 pacientes con la enfermedad y 15 de sujetos sanos, encontramos diferencias significativas entre la 2 concentraciones. Hubo correlación entre las concentraciones de IL-18 y la severidad clínica de la enfermedad.

Conclusión. Las concentraciones de la IL-18 en el pénfigo vulgar son más elevadas que en sujetos sanos y se correlacionan con la severidad de la enfermedad.

Abstract.

Introduction. Pemphigus vulgaris (PV) is a chronic mucocutaneous bullous disease of unknown origin, sometimes related to steroids response, the main treatment, and so can be a cause of a 15-20% mortality in countries that don't have adequate facilities to treat this kind of disease. IL-18 is a cytokine involved in the pathogenesis of PV concerning about apoptosis (a cause of acantholisis), and about autoantibodies (that also induces acantholisis, a major step in PV). We propose the use of IL-18 as a marker and predictor of mucocutaneous severity in PV.

Objective. To evaluate the potential of plasmatic levels of IL-18 as a marker and predictor of epidermal damage in patients with PV.

Methodology. We perform a longitudinal, prospective, analytic and observational study. We determined the plasmatic concentrations of IL-18 by means of ELISA. Results were correlated performing a Pearson's correlate test.

Results. We analyze plasma samples of 33 patients with PV and of 15 healthy subjects, with significant differences. We found correlation between IL-18 and disease activity.

Conclusions. IL-18 concentrations in PV were more elevated that in healthy subjects and had correlation with disease activity.

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.

FIGURAS.

Figura 1. Patogenia del pénfigo vulgar…….… 13
Figura 2. Valores de IL-18 de sujetos sanos…… 44
Figura 2. Relación de la IL-18 con la edad y el sexo de sujetos sanos….. 45
Figura 3. Valores de IL-18 en PV……..…. 46
Figura 4. Relación de la IL-18 con el sexo en PV…… 46
Figura 5. Relación de la IL-18 con la edad en años en PV…… 47
Figura 6. Correlación entre los niveles de IL-18 y la superficie corporal afectada en PV…….. 48
Figura 7. Correlación por intervalos de la IL-18 con severidad cutánea..... 49
Figura 8. Agravamiento en PV en relación a la tendencia de la IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de o-99 pg/mL)……...… 50
Figura 9. Agravamiento en PV en relación a la tendencia de la IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de 100-199 pg/mL)……... 51
Figura 10. Agravamiento en PV en relación a la tendencia de la IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de 200-299 pg/mL)…… 52
Figura 11. Agravamiento en PV en relación a la tendencia de la IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de >299 pg/mL)……..… 53

TABLAS.

Tabla 1. Datos demográficos y clínicos de la muestra estudiada……..… 43
Tabla 2. Estratificación de los valores de IL-18 en PV……..…. 48

MARCO TEÓRICO.

Generalidades.

Antecedentes históricos.

El pénfigo es un padecimiento autoinmune de la piel y mucosas de origen desconocido en el que se forman ampollas flácidas debido a un defecto en la cohesión celular, las cuales al romperse dejan áreas denudadas de difícil recuperación[1,2]

La palabra "pénfigo" proviene del vocablo griego *pemphix* que significa ampolla o burbuja, en alusión a las lesiones elementales de la enfermedad.

Existen muchos reportes antiguos de enfermedades ampollosas. Hipócrates describió la fiebre penfigoide y Galeno añade el signo de afección oral a la descripción de Hipócrates. No obstante, resulta complicado asegurar que éstas son las primeras descripciones del pénfigo. [1,2]

De Sauvages en 1700, utilizó por primera vez el término pénfigo, para describir una erupción ampollosa de corta duración. [3] Wichmann en 1791 utilizó el término para designar a una enfermedad ampollosa crónica que corresponde con el concepto actual. [4]

MacBride en 1777, identificó los primeros casos y catalogó por primera vez al pénfigo vulgar como una enfermedad ampollosa que denominó *Morbus vesicularis*. [5] Hebra, en 1860, restableció el concepto de Wichmann y caracterizó al pénfigo como una enfermedad ampollosa crónica, sin reconocer la existencia de la forma aguda de la misma. [6]

Dentro del estudio de la enfermedad, la acantólisis, fenómeno causal de la enfermedad, fue descrita desde 1881 por Auspitz. [7] Civatte en 1943 describió las características histológicas del pénfigo vulgar, del vegetante y del foliáceo.

En 1947, Tzank introdujo el término citológico. En 1953, Lever describió las características clínicas e histológicas del penfigoide ampolloso y lo diferenció del pénfigo verdadero. [8]

En 1898, Nikolsky describió el signo que lleva su nombre, como el desprendimiento de la epidermis ocurrido al ejercer una presión lateral con el dedo sobre la piel. [9]

Uno de los avances más relevantes en el entendimiento de esta patología fue el descubrimiento de los autoanticuerpos circulantes en el suero de pacientes con pénfigo, utilizando para ello el método de inmunofluorescencia de Beutner y Jordan en 1964. [10] En 1982, Anhalt y Díaz demostraron la patogenicidad de estos anticuerpos mediante el uso de un modelo murino. [11]

Clasificación

Actualmente el pénfigo vulgar se divide de la siguiente manera:

-Pénfigo vulgar.- En una enfermedad ampollosa mucocutanea crónica caracterizada por ampollas fláccidas, que dejan extensas exulceraciones y agravan el pronóstico por desequilibrio hidroelectrolítico e infecciones bacterianas, y que conlleva una mortalidad del 8-15%.

-Pénfigo vegetante.- Es una variante del pénfigo vulgar localizada que produce grandes vegetaciones sobre todo en región sacrococcigea, no tiene riesgo de mortalidad.

-Pénfigo foliáceo.- Es una enfermedad ampollosa crónica caracterizada por tener ampollas muy superficiales y que inducen prurito más que dolor y que conlleva una mortalidad de menos del 5%.

-Pénfigo seborreíco o eritematoso. ES uma variante localizada del pênfigo foliáceo, que afecta cara y tronco, no produce mortalidad pero si intenso prurito.

-Pénfigo inducido por fármacos.- variedad de pénfigo muy polimorfa caracterizada por parecerse a cualquier variedad de pénfigo pero que al suspender el fármaco desencadenante, se controla, inducida principalmente por d-penicilamina y por IECAs.

-Pénfigo Herpetiforme.- Caracterizado por desarrollo de ampollas simétricas de distribución lineal, sobre todo en tronco.

- Pénfigo IgA.- Variedad muy parecida al herpetiforme, pero que tiene tendencia a elevar en suero y tejidos la IgA.

-Pénfigo paraneoplásico.- variedad de pénfigo muy parecida al vulgar, con gran afección a mucosas relacionado a timomas, enfermedad de Castleman y otros procesos linfoproliferativos..

Epidemiologia.

La incidencia mundial reportada oscila entre 0.5 a 4.0 por 100,000 habitantes por año**,** [12] dependiendo los factores geográficos y étnicos.

El pénfigo vulgar es la variedad de pénfigo más frecuente. Ocurre con igual frecuencia en hombres y mujeres, entre la quinta y sexta década de la vida. La incidencia va de 0.1 a 0.5 casos por 100,000 habitantes por año en población general. [13] Afecta a todas las razas, con predominio en los judíos Asquenazí con una incidencia entre 1.6 y 3.2 por casos por 100,000 habitantes por año. En regiones donde la población judía predomina hay mayor incidencia: Jerusalén tiene una incidencia estimada de 1.6 por 100,000 habitantes, Connecticut 0.4 por 100,000, Túnez, 2.5 por millón por año, Francia 1.3 por millón por año. [14]

En México, la frecuencia de casos nuevos por año mostró una tendencia al aumento, 58 casos vistos en 1980, en comparación con 123 casos detectados en la siguiente década. [15]

Etiopatogenia

La etiología del pénfigo es desconocida. Se coloca dentro de las enfermedades autoinmunes órgano-específicas. La susceptibilidad de las enfermedades autoinmunes es multifactorial. [16] Pueden existir factores endógenos (genéticos) y exógenos (ambientales) que juegan un papel importante en la etiopatogenesis.

-Factores genéticos:

Los factores genéticos pueden influir de forma importante. Uno de los principales es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MCH es una región de genes polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie celular. Está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 en 6p21.3. La respuesta inmune de

los anticuerpos y células T es iniciada a través de los genes contenidos en el MHC. Se subdivide en tres clases basadas en las características funcionales de cada clase (clase I, II, III). [17]

El antígeno leucocitario humano (HLA) se codifica en el MHC; diversos estudios han mostrado que personas con ciertos alelos tienen un riesgo alto de padecer enfermedades autoinmunes específicas. [18]

Se ha encontrado en pacientes con pénfigo la asociación con MHC clase II; HLA-DR4 (DRB1*0402) y HLA-Drw6 (DQB1*0503), en pacientes judíos se encuentran dos halotipos: HLA-B38, SC21, DR4, DQw8 y HLA-B35, SC31, DR4, Dqw8. También se ha observado un aumento en la frecuencia de HLA-A26, B38 Y DR4 en pacientes judíos Asquenazí ya que la distribución de HLA- DR4, Dwq8 en pacientes judíos es de carácter dominante. [19] En griegos, son el HLA-B22 (w54, w55 o w56) y el DRB1*04 y en japoneses, el DRB1*14. En el *fogo selvagem* existe una asociación con el HLA- DRB1. [20]

En pacientes mexicanos con pénfigo el HLA-DR14 (DR6) fue el más común. En pacientes con pénfigo foliáceo se observó que el alelo HLA-DR1 está fuertemente asociado con esa variedad clínica y su presencia en nuestra población representa un riesgo relativo muy elevado para padecer la enfermedad. [21]

Las moléculas de histo-compatibilidad asociadas con pénfigo permiten la presentación de péptidos de desmogleina 3 o 1 en las células T. Se ha encontrado que algunos péptidos de desmogleína 3 son capaces de encajar en el sitio de unión de un alelo HLA-DR específico y estimulan a las células T de los pacientes. [22]

-Factores ambientales:

a) Infecciones.

Las infecciones virales en especial en herpes virus se han identificado como posibles factores desencadenantes del pénfigo. Se ha encontrado secuencias de ADN del herpes virus tipo 8 en lesiones de pacientes con pénfigo vulgar, pero su presencia se puede deber al tropismo del virus hacia estas lesiones.[23] También se han encontrado secuencias de DNA del virus Epstein-Barr, de la varicela-zoster, y del herpes virus tipo 6. Al parecer el citomegalovirus puede inducir pénfigo

foliáceo. El posible rol de interferones y de interleucinas en la patogénesis del pénfigo inducido por virus está aún en discusión. [24]

b) medicamentos.

Existen pacientes en los que el pénfigo es inducido por medicamentos. Los fármacos inducen una respuesta inmune de hipersensibilidad tipo II (citotóxica-citolítica).

Estos pacientes se pueden dividir en dos grupos:

1.- Pénfigo dependiente del medicamento: donde factores exógenos como el grupo tiol (-SH) esta implicado en inducir el pénfigo. El pénfigo usualmente es reversible cuando se suspende el medicamento. Producen con mayor frecuencia pénfigo foliáceo el cual se desarrolla en los primeros 12 a 24 meses de iniciar la administración del medicamento. [25]

2.- Pénfigo verdadero desencadenado por un medicamento: cuando el paciente tiene predisposición genética (DRB1*0402, DRB1*1402 y DRB1*0701) para pénfigo y factores exógenos sin el grupo tiol son requisitos para desencadenar la enfermedad. [26]

Diversos mecanismos se han postulado en este tipo de pénfigos:

a) El grupo tiol puede formar uniones de bisulfito con la placoglobina y probablemente también a la desmogleina 1 y 3, [27] produciendo alteración de la molécula, formando un neoantígeno con la producción de anticuerpos. Estos anticuerpos se unen a la placoglobina produciendo falla en la unión intercelular y acantolisis a través de la activación de mecanismos endógenos. [28]
b) Los medicamentos con el grupo tiol interfieren directamente con el sistema inmune. La D-penicilamina tiene acción directa en linfocitos, promueve la activación de células $CD4^+$ Th2. además las uniones sulfhidrilo y bisulfito tienen un papel importante en el desarrollo de γ-globulinas específicas.
c) El grupo tiol produce acantolisis sin producción de anticuerpos. Lo hace a través de mecanismos bioquímicos.

d) El fármaco produce disolución de los complejos desmosomales y probablemente expone antígenos que producen una respuesta inmune.
e) Los medicamentos sin grupo tiol son aquellos con o sin grupo sulfuro en su estructura pero forman el grupo tiol *in vivo.* También presentan un grupo amida que se ha especulado que también puede ser responsable de la inducción de la enfermedad.
f) Los medicamentos no tioles inducen acantolisis por mecanismos inmunes. Diversos estudios han encontrado la presencia de autoanticuerpos que reconocen los antígenos del pénfigo en particular desmogleína 3, por lo que estos pacientes desarrollan un pénfigo vulgar.

Los medicamentos implicados son:

Tioles: D-Penicilamina, captopril, piroxicam, 5-tiopiridoxina, tiomolato sódico de oro, enalapril. Penicilina y derivados producen degradación hidrolítica de la molécula a penicilamina. Aspirina, rifampicina y cefalosporinas contienen un grupo fenol, polifenoles tienen otro ácido tánico involucrado como factor inductor de pénfigo. Otros medicamentos como fenobarbital, levodopa, propanolol, interleucina-2, heroína, pirazolonas y sus derivados.

c) Alimentos

Algunos productos alimenticios se piensa que pudieran ser desencadenantes del pénfigo ya que tienen componentes similares a los medicamentos inductores de pénfigo tales como el grupo tiol (ajo, cebolla), isotiocianatos (aceite de mostaza), fenoles (tintura de benzoina, cromato, aspartame, canela, vainilla, vitaminas C y el ácido cinámico que se encuentra presente en manzanas, uvas, naranjas, piñas y jugo de tomates), taninos (mango, guaraná, cereza, aguacate, durazno, té, café, cerveza, vino, chile y pimienta negra). [29] Este aspecto de la dieta todavía es controvertido y su papel aun está por determinarse.

d) Clima y luz ultravioleta

Otros factores que se han postulado como determinantes para el desarrollo de la enfermedad son las temperaturas elevadas y las radiaciones ultravioletas que inducen actividad de IL-1 y producción de proteínas reactantes de fase aguda resultando en la quimiotaxis de neutrófilos, así como proliferación de células T. También aumenta la producción de IL-3, IL-6 y factores hematopoyéticos estimulantes de colonias, seguido de una respuesta de células B y la inducción de antigenos. [30] La radiación ultravioleta es un factor desencadenante de acantolisis debido a que aumenta la actividad proteolítica de las enzimas implicadas en los factores de acantólisis, [31] unión de IgG y de C3 en espacio intercelular epidérmico, aumento en el número de epítopes de desmogleínas 1 y 3 que reaccionan con los autoanticuerpos patogénicos, y apoptosis de los queratinocitos que hacen a las células más susceptibles a la inducción de acantolisis por auto anticuerpos. [32]

Fisiopatogenia

Dentro de la fisiopatogenia del pénfigo, los mecanismos de adhesión de las células epiteliales son de gran importancia, ya que el pénfigo es una enfermedad en la que se encuentran anticuerpos patogénicos anti-cadherinas. Las cadherinas son una superfamilia de moléculas de adhesión dependientes de calcio, todas comparten un dominio extracelular común, además presentan dominios extra e intracelulares que las clasifica en diversas subfamilias, de las que las más importantes son cadherinas clásicas y desmosomales. [33]

Las cadherinas desmosomales incluyen a glicoproteínas de membrana (desmocolinas y desmogleínas) y placa citoplasmática (desmoplaquinas y placoglobinas). [34] Las desmogleínas se encuentran localizadas en el cromosoma 18q12, [35] con los isotipos: Dsg1 y Dsg3 con expresión en el epitelio escamosos estratificado, Dsg2 epitelio simple y miocardio. [36] La Dsg4 se expresa en el pelo, mucosa, cerebro, músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas, glandula salival, próstata y timo. [37] Recientemente se han descubierto dos nuevas isoformas de desmogleinas en ratones Dsg5 y Dsg6. [38]

Los pacientes con pénfigo presentan anticuerpos circulantes que se unen específicamente a un constituyente del epitelio escamoso normal y se les llamó

antígenos del pénfigo. En 1982 Stanley y col, caracterizaron por inmunoprecipitación utilizando cultivos de extractos de queratinocitos como sustrato, el antígeno del pénfigo vulgar como una glicoproteína de 130 kD el cual corresponde a la desmogleína 3 y en 1984 caracterizaron mediante inmunoblot e inmunoprecipitación, el antígeno del pénfigo foliáceo como una glicoproteína de 160kD identificado como desmogleína 1. [39]

Se ha propuesto que los anticuerpos del pénfigo estimulan la síntesis y secreción del activador del plasminógeno, que a través de proteólisis, produce digestión de los desmosomas. [40]

Otros estudios en modelos de ratón neonato, han mostrado que la disminución del activador del plasminógeno no inhibe la formación de ampollas por la IgG, por lo que concluyen que no es necesario en la inducción de acantólisis. [41] Se ha observado que la IgG activa señales intracelulares dando como consecuencia la fosforilación aberrante de la Dsg. [42]

Otras vías involucradas son la activación de fosfolipasa C, aumento de inositol 1, 4, 5-trifosfato, lo que aumenta el calcio intracelular y activación de proteincinasa C. Se necesitan más estudios para entender mejor la activación de esas señales de traducción en el pénfigo. [43]

A continuación se detallará más sobre los tres elementos más importantes en la patogenia del pénfigo, los autoanticuerpos IgG, los linfocitos T y las citocinas.

-Isotipos de IgG:

Se ha caracterizado los epitopes conformacionales de los autoantigenos de Dsg1 y Dsg3. El ectodominio N-terminal contiene los epitopes que son reconocidos por la IgG. [44] Existen dos isotipos de autoanticuerpos anti-desmogleína: IgG1 e IgG4, el isotipo de los anticuerpos producidos por linfocitos B dependen de las señales de citocinas que reciben de los linfocitos T específicos. [45]

Estudios previos muestran que la IgG4 se asocia a la actividad de la enfermedad y la IgG1 a la remisión. Se ha visto que la IgG1 reconoce el epitope lineal y la IgG4 el epitope que tiene un papel importante en la producción de anticuerpos patógenos en el pénfigo. Los estudios que detectan anticuerpos antiDsg3 en plasma, lo hacen detectando la fracción IgG4. [46]

-Linfocitos T:

Los linfocitos T son células importantes para mantener el control en el sistema inmune para evitar que reaccionen contra antígenos propios. La inhabilidad de regular a las células T reactivas contra antígenos propios puede dar a lugar al desarrollo de enfermedades autoinmunes (pérdida de la tolerancia).

La producción de anticuerpos por las células B requiere de la participación de las células T ayudadoras en células T dependientes de la respuesta a los anticuerpos. [47] La Dsg puede tener un epitope relevante en la interacción de las células T y B. La respuesta inmune inicial en los pacientes con pénfigo puede ser de inicio directamente en contra de un epitope principal y posteriormente existir una expansión en los otros epitopes de la molécula, este fenómeno se denomina de "expansión determinante". [48]

La población de linfocitos T que más responde contra la Dsg1 y 3 son los $CD4^+$. También se ha sugerido la participación del receptor transmembrana CD28, el cual está involucrado en el control del cambio de Th1-Th2 durante la progresión de la enfermedad. Su coestimulación es crucial en el desarrollo de la respuesta Th2. [49]

Se conoce que el isotipo de los anticuerpos producidos por las células B es dependiente de los linfocitos Th que se encuentren durante la interacción de las células T-B. Las células T que secretan citocinas Th1, estimulan a las células B para producir IgG1 y las citocinas Th2 inducen a las células B para secretar IgG4. [49]

-Citocinas:

Existe un patrón de producción de citocinas en el pénfigo: tipo Th1 de las que predomina IL-2, interferón γ (IFN-γ), IL-12, IL-18 y Th2 IL-4, 5, 10 y 13.

Se han realizado diversos estudios encontrando las siguientes citocinas: Biopsias perilesionales de pacientes con pénfigo vulgar expresan una mezcla del fenotipo Th1-Th2, caracterizado por la presencia de IL-2, 4 y de IFN-γ. [50] Se ha visto un aumento de los niveles de IL-15 en pénfigo vulgar y pénfigo eritematoso. La IL-15 aumenta la migración transendotelial y activación de células T y de las células NK. [51]

Las citocinas TNFα y la IL-6 se han detectado alrededor de las ampollas en el pénfigo así como un aumento en los niveles séricos. [52] Los niveles de estas citocinas correlacionan con la extensión de la lesión. El rol potencial de TNFα y de la IL-6 favorece las señales de transducción induciendo las cascadas de apoptosis. [53]

Se ha sugerido que la IgG del pénfigo induce la producción de IL-1 y TNFα, dando como consecuencia acantolisis a través de un aumento en el activador del plasminógeno tipo uroquinasa y síntesis de C3 en los queratinocitos. [54]

Se han encontrado niveles elevados en suero de pacientes con pénfigo vulgar activo de IL-10, correlacionado con la severidad, actividad y títulos de anticuerpos antidesmogleinas. La IL-10 a nivel sistémico aumenta y promueve la producción de autoanticuerpos y a nivel cutáneo disminuye la inflamación local. Se produce localmente por los queratinocitos en respuesta a señales generadas por las células acantolíticas. Estos datos sugieren que las citocinas inflamatorias participan en la producción de lesiones en pénfigo de una manera que aún no está determinada. [55] Trataremos el tema de las citocinas (IL-18) en enfermedades inmunológicas más adelante.

La apoptosis es un último mecanismo estudiado en enfermedades inmunológicas, entre ellas el pénfigo vulgar. La apoptosis juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis celular, y está involucrada en muchos procesos fisiopatogénicos. La apoptosis puede seguir a la separación entre célula y célula con la pérdida de la interacción de la matriz celular (proceso llamado “anoikis”, que se produce en células epiteliales). [56]

Se ha reportado recientemente una función de las proteínas relacionadas con *Fas* en este tipo de apoptosis. [57] *Fas* es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se une al ligando *Fas* (*FasL*) desencadenando la apoptosis en muchos sistemas celulares. [58] Recientemente se ha propuesto una relación entre acantolisis y anoikis. Se han encontrado niveles elevados séricos de *FasL* en pacientes sin tratamiento. Los sueros de los pacientes con pénfigo inducen apoptosis en los queratinocitos a través de la vía extrínseca de apoptosis a través del sistema de *Fas*/*FasL*, iniciando la activación temprana de caspasa 8.

El tratamiento con esteroides reduce el *FasL*, este tratamiento modula los procesos de apoptosis. [59] Los desmosomas son el blanco durante la apoptosis y también se ha visto que la caspasa 3 divide la Dsg3. [60] La patogenia de la enfermedad se presenta en la figura 1.

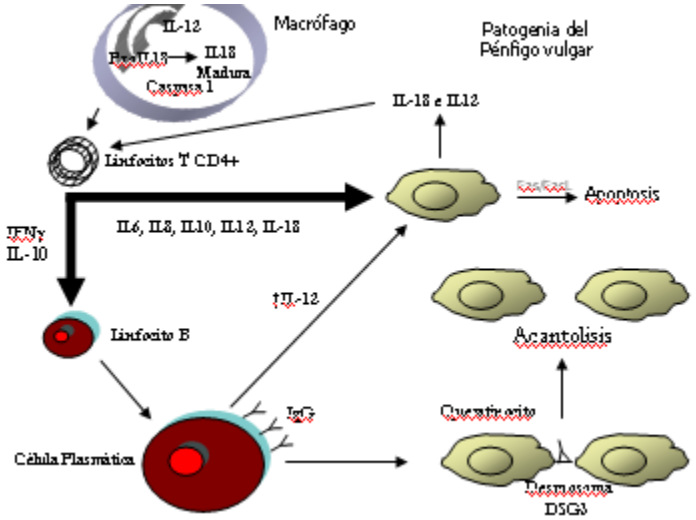

Figura 1. Patogenia del pénfigo vulgar

Manifestaciones Clínicas

El pénfigo vulgar se caracteriza por la presencia de ampollas flácidas, de contenido seroso, que aparecen en piel sana o eritematosa y al romperse dejan áreas denudadas y costras melicéricas. Las lesiones son de curación lenta, no dejan cicatriz, sólo placas hiperpigmentadas residuales. Se presenta el signo de Nikolsky que consiste en la aplicación de presión sobre la piel sana, ocasionando su desprendimiento y el signo de Asboe-Hansen, el cual se realiza ejerciendo presión sobre una ampolla sana, ocasionando su extensión lateral. Los síntomas principales son dolor intenso en las áreas denudadas. La distribución puede ser localizada o generalizada y afectar cualquier parte de la piel y mucosas. [61]

En México, el sitio de inicio de la enfermedad más frecuente es en la boca 41%, piel cabelluda 31% y tronco 18%. La mucosa oral puede ser en ocasiones la única área afectada, mientras en algunos otros casos se disemina rápidamente al resto de la piel; sin embargo, en otros puede permanecer en esa zona por varios meses y posteriormente aparecer en otras áreas, o bien sólo afectar la mucosa de la boca

y no desarrollar nunca lesiones en otros sitios. La afección de las mucosas incluye además de la oral la faríngea, laríngea, nasal, conjuntivas, esofágica, vulvar y anal. La afección esofágica se reporta poco en la literatura. [61,62]

Fases de la enfermedad

Durante el tratamiento del paciente con pénfigo vulgar, se debe tener en cuenta las fases de la enfermedad para determinar el tratamiento y las dosis de los medicamentos por utilizar:

1. Fase de Actividad: El paciente presenta datos clínicos e inmunológicos compatibles con pénfigo vulgar, con el signo de Nikolsky positivo y nuevas ampollas. Se va a determinar el esquema y dosis de la terapia a utilizar. El tratamiento de inicio en esta fase es con esteroides sistémicos, a dosis de 1mg/kg de peso por día manteniendo al menos durante 3 meses. Es la fase en la que se ve al paciente de primera vez en 80% de los casos y es la fase más severa de la enfermedad.
2. Fase de Control: Se encuentra la dosis ideal de medicamentos que van a evitar la formación de nuevas ampollas y van a permitir la reepitalización. Cuando se produce la fase de control el esquema de inmunosupresor no se modifica, ya que las recaídas son frecuentes. la reducción empieza hasta alcanzar la fase de consolidación. La fase de control habitualmente se obtiene después de los 3 meses de inmunosupresor a dosis plena (1mg/Kg. de peso/día).
3. Fase de Consolidación: No hay aparición de nuevas lesiones y se presenta reepitalización del 80-90% de las preexistentes, en este momento es cuando se inicia la reducción de los medicamentos. La reducción del esteroide se hace de acuerdo al siguiente esquema, de 10mg de esteroide cada 2 semanas hasta llegar a una dosis diaria de 20mg, entonces se inicia reducción de 5mg cada 2 semanas hasta suspender.

4. Remisión Clínica: Se define cuando no existen nuevas lesiones y presenta reepitalización total de las preexistentes, por un tiempo mayor a 6 meses sin o con terapia de mantenimiento que debe ser una dosis menor a 20mg/día de prednisona.
5. Se considera Exacerbación cuando aparecen nuevas lesiones durante la fase de control o consolidación y Recaída cuando ocurre la fase de remisión clínica. Cuando un caso se exacerba, la dosis actual de esteroide se duplica (hasta un tope de 100mg/día) y se considerará como en la fase de actividad, mientras que en un caso de recaída se inicia la dosis habitual de 1mg/kg de peso/día y se considerará como en la fase de actividad.

Métodos diagnósticos

Los métodos de diagnóstico del PV son importantes debido a que el diagnóstico diferencial entre las distintas variedades de pénfigo es amplio y no siempre se tiene un diagnóstico clínico claro. Los criterios de diagnóstico para el pénfigo, incluyen criterios clínicos, histológicos e inmunológicos, con los tres es posible estructurar de manera adecuada un diagnóstico de pénfigo, apoyando en el fácil diagnóstico diferencial de las distintas variedades de la enfermedad. A continuación se enunciarán las principales recursos de diagnóstico con los que contamos actualmente.

Examen Histopatológico:

Es importante elegir ampollas recientes para la realización de la biopsia, de preferencia ampollas pequeñas. Los primeros cambios consisten en edema y la desaparición de los puentes intercelulares en la epidermis inferior. La pérdida de la cohesión entre las células epidérmicas es un proceso conocido como acantolisis, esta lleva a la formación de hendiduras y posteriormente de ampollas intraepidérmicas suprabasales. Las células basales separadas entre si por la desaparición de los puentes, quedan unidas a la dermis como una hilera de lápidas, las células acantoliticas dentro de la ampolla aparecen redondeadas con núcleo hipercromático grande y citoplasma homogéneo. El piso de la ampolla se encuentra con crecimiento ascendente irregular de las papilas tapizadas por una

sola hilera de células basales. El techo de las ampollas está constituido por el estrato espinoso intacto. La inflamación inicialmente es escasa, principalmente por eosinófilos. En la etapa de cicatrización, la proliferación ascendente de las papilas y descendente de las bandas epidérmicas puede ser considerable. [63]

Inmunofluorescencia directa (IFD):

Se realiza utilizando cortes cutáneos perilesionales o sanos, cogelados y sin fijar. Se aplican anticuerpos contra la IgG, IgA, IgM y C3 humano, marcados con fluoresceína. Si la prueba es positiva se percibe fluorescencia en lso espacios intercelulares de la epidermis. Casi siempre se detectan depósitos de IgG (imagen en panal de abeja). Los anticuerpos se localizan en el punto exacto de la formación de ampollas en la mitad de los México se encontró que la IFD en piel tiene una sensibilidad del 77.7% y especificad del 100%, en mucosa oral del 83.3% y 100% y en mucosa esofágica 78.9% y no fue valorable para le determinación de la especificidad. [63]

Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Se utilizan cortes congelados de esófago de cobayo, mono o piel humana normal. Se agregan las diferentes disoluciones del suero del paciente (1:80, 1:160, 1:320, etc.) al sustrato congelado, se incuba de 30-40min. A temperatura ambiente en cámara húmeda. Lavado 3 veces 10 minutos cada vez con buffer de fosfato salino (PBS), se agrega el conjugado anti inmunoglobulinas marcadas con fluorescencia, incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos, el segundo será con PBS. Finalmente se realiza el montaje en un medio en un medio acuoso y son vistas en el microscopio fluorescente equipado con filtros apropiados. [64] En un estudio realizado en el Hospital General de México la IFI en mucosas esofágica de mono tiene mayor sensibilidad y especificidad de 97.25 y 100% respectivamente, en piel humana fue baja siendo un 41.7%.

Ensayo inmunoabsorbente de unión enzimatica (ELISA) desmogleína 1 y 3:

En 1991 Amagai y col, [65] clonaron el gen de la desmogleína 1 y 3, generaron proteínas recombinantes de ectodominio de las desmogleinas a través del sistema de expresión de baculovirus, observando que son capaces de absorber anticuerpos patogénicos de suero de pacientes con pénfigo vulgar y foliáceo. [66]

Gracias a la utilización de estos antígenos recombinantes se ha desarrollado del método de ELISA, técnica cuantitativa para la detección de anticuerpos antidesmogleína. [65] El método de ELISA representa una prueba sensitiva y específica de enfermedad para el diagnóstico de pénfigo. [67]

-Diagnostico:

El diagnóstico del pénfigo depende de la clínica, biopsia y de la IFD e IFI estos últimos dos métodos son subjetivos y requieren de un examinador experto, y casi siempre no se puede distinguir entre pénfigo vulgar y foliáceo. Actualmente el método de ELISA representa una prueba sensible, específica y cuantitativa para el diagnóstico de pénfigo. [68]

-Fenotipo:

La severidad de la afección a la piel y mucosas en los pacientes con pénfigo vulgar está determinada por el perfil de anticuerpos contra desmogleínas clasificándose en dos fenotipos:

a) Mucoso dominante: Presenta erosiones extensas a nivel de mucosa oral, nasal, ocular y esofágica. Afección limitada a piel. Presenta autoanticuerpos dirigidos únicamente contra Dsg3.

b) Mucocutáneo: Afección extensa a piel, además de otras mucosas. Presenta auto anticuerpos dirigidos contra Dsg3 y Dsg1. [69]

En la piel la Dsg1 se expresa a través de toda la epidermis, pero con mayor intensidad en las capas superficiales, la Dsg3 se expresa en la parte baja de la epidermis. En las mucosas la Dsg1 y Dsg3 se expresan a través del epitelio escamoso, pero es mayor la expresión Dsg3. [39]

La “teoría compensatoria” explica que los sueros de los pacientes con anti Dsg3 (Fenotipo Mucoso dominante) presentan algunas lesiones a nivel de la piel debido a la compensación de la Dsg1. a nivel de Dsg1 es incapaz de descompensar la función de la Dsg3 debido a su baja expresión. [39]

Los sueros con anti-Dsg1 y 3 (Fenotipo Mucocutáneo) presentan ampollas extensas y erosiones en las mucosas debido a que hay alteración en la función de ambas desmogleínas. [39]

El fenotipo clínico del pénfigo vulgar se asocia al perfil inmunológico de anticuerpos anti-Dsg, factores genéticos probablemente estén implicados en el perfil de auto anticuerpos. Alelos del HLA predisponen al desarrollo de anticuerpos anti-Dsg1 y 3, y se ha observado que pacientes con anti-Dsg3 y Dsg1 tienen el riesgo de desarrollar un fenotipo más severo con lesiones cutáneas extensas. [70]

Esta clasificación del pénfigo vulgar en sus 2 fenotipos es de utilidad para entender los mecanismos fisiopatogénicos de la formación de las lesiones, para evaluar la severidad de la enfermedad y dar un pronóstico. [39]

Tratamiento del Pénfigo vulgar y dificultades en el mismo.

Antes de la era de los corticoides en 1950, la mortalidad por pénfigo era de 90%; tras el desarrollo de los corticoides disminuyó en forma muy importante. Su efecto benéfico principalmente se debe a la capacidad para inhibir la síntesis de anticuerpos. El más usado de ellos es la prednisona. Se utilizan dosis elevadas al inicio. Se calcula en casos de pénfigo vulgar severo, una dosis de 100 mg a 150 mg /día (1-1.5mg/kg/día) durante seis a doce semanas hasta el control del padecimiento; es decir, hasta no existan nuevas lesiones; posteriormente se disminuye gradualmente hasta alcanzar 20 mg/día, el promedio es una reducción de 5 mg cada ocho días, para llegar a una dosis de mantenimiento de 5 mg diarios, esta reducción se alcanza lentamente, a veces toma varios meses. La dosis se continúa indefinidamente o se puede suspender dependiendo de cada caso.

Otros medicamentos inmunosupresores se usan en combinación con esteroides, en los siguientes casos:

- Pacientes con contraindicaciones para recibir esteroides (úlcera péptica, diabetes, osteoporosis, catarata, etc.).
- Pacientes que no responden a dosis altas de esteroides por un tiempo adecuado.

Azatioprina. La dosis es de 2.5 mg/kg/día o 100 a 150 mg diarios. Se deben realizar pruebas hepáticas, renales y hematológicas de control. Su efecto terapéutico se observa hasta después de ocho semanas de iniciado el tratamiento.

Metotrexato. La dosis recomendada es de 35 mg a la semana vía oral. Se

requieren pruebas hepáticas, renales y hematológicas para monitoreo. No está indicado en el pénfigo oral porque agrava las lesiones.
Ciclofosfamida. Se utiliza a dosis de 50 a 100 mg diarios. Puede producir depresión de médula ósea y cistitis hemorrágica.
Sulfonas. La dosis es 100 mg por día. Las complicaciones son anemia y metahemoglobinemia.
Terapia con oro. Se recomiendan 10 mg por semana (inyección) hasta llegar a 50 mg cada dos a cuatro semanas durante 35 semanas. Puede producir agranulocitosis y síndrome nefrótico.
Se ha utilizado la *ciclosporina*, con el inconveniente de ser nefrotóxica, la *plasmaféresis* y *fotoféresis extracorpórea* con buenos resultados, aunque puede haber complicaciones como hipovolemia, trombosis e infecciones. Otro tratamiento indicado es el micofenolato de mofetilo aunque aun no se aprueba oficialmente para su uso.
En el tratamiento local se recomiendan fomentos o baños con sulfato de cobre o permanganato de potasio, polvos como óxido de zinc y talco o lociones alba.
Los diferentes recursos disponibles para tratar el PV indican la dificultad de encontrar el tratamiento idóneo para todos los pacientes, sobre todo cuando se habla de que la prednisona, el tratamiento de primera elección, incrementa el riesgo de muerte hasta en un 10% en el PV, de ahí la necesidad de buscar alternativas para monitorizar la enfermedad y predecir el curso de la misma con el tratamiento.

Monitoreo de la enfermedad.

Se ha intentado correlacionar la severidad del pénfigo con los niveles de anticuerpos utilizando IFI; sin embargo, diversos estudios han concluido que no siempre existe una buena correlación con la severidad. La IFI es una técnica semicuantitativa y subjetiva. Escasos reportes en la literatura muestran una relación entre la actividad de la enfermedad y los valores de anticuerpos antidesmogleína, pero hasta el momento no se ha publicado un estudio prospectivo que examine los cambios en los niveles de anticuerpos con relación a los cambios en la actividad de la enfermedad. Se ha visto relación entre la

severidad de las lesiones, a nivel oral, y los anticuerpos antiDsg3 y la severidad cutánea con los antiDsg1 y 3. [71-73]

-Tratamiento y Pronóstico:

Los factores indicadores para el pronóstico del pénfigo son:
1. Edad en la que se inicia. Es más severo en ancianos.
2. Progreso de la enfermedad antes del inicio del tratamiento. Peor pronóstico si se disemina rápidamente.
3. Extensión. Si está ampliamente diseminado la mortalidad es mayor.
4. La dosis de esteroide necesaria para el control. Si es mayor a 150 mg/día de prednisona el pronóstico es más grave.
5. Variante clínica. El pénfigo vulgar tiene el peor pronóstico con la más alta mortalidad.

El curso del pénfigo es variable e impredecible. En series de pacientes estudiados por 15 años se encontró que 10% mueren por las complicaciones del tratamiento, 8% muere por causas no relacionadas a la enfermedad ni al tratamiento, 40% tuvieron remisión y no necesitaron tratamiento posterior, 15% requirieron dosis bajas de mantenimiento con corticoides y/o inmunosupresores para mantenerlos en receso y 27% tuvieron moderada actividad de la enfermedad con periodos de remisión y exacerbación con intervalos de dos meses a 10 años. [4,8,15]

En la actualidad se conoce poco acerca de marcadores de actividad de la enfermedad y sobre todo de predIctores de la misma. La determinación de los títulos de anticuerpos antidesmogleína 3 es de utilidad para la decisión en el tratamiento y el pronóstico del paciente. Se pueden utilizar para realizar estrategias de tratamientos y decidir cuándo reducir la dosis de esteroides y predecir exacerbaciones y recaídas detectando el aumento de los anticuerpos antes de la evidencia clínica de la exacerbación de la enfermedad. [74] IndudablementeSe necesitan más estudios prospectivos para confirmar la utilidad real de este marcador.

Como se mencionó en líneas anteriores, las citocinas juegan un papel muy importante en el proceso de autoinmunidad. La asociación del PV con diversas citocinas proinflamatorias relacionadas con su actividad se ha descrito en

numerosas ocasiones. Las citocinas asociadas mas estudiadas son la IL-10, la IL-8 y el interferón-γ, lo cuál demuestra que el PV presenta un mecanismo inmunológico de tipo Th1. Estos productos celulares, entre muchas de sus actividades inmunológicas, inducen la activación de linfocitos B para proliferar y diferenciarse para producir anticuerpos, por lo tanto, se debe pensar que una elevación de estos productos celulares (citocinas), debería influir directamente en la activación de los linfocitos B, con producción de anticuerpos antidesmogleína, traduciéndose clínicamente en una aparición mayor de ampollas que reflejarían una reactivación del PV. Dicha elevación de citocinas incluso preceden a las manifestaciones clínicas. [50-52]

Una de las citocinas proinflamatorias relacionadas con el proceso de autoimunidad que se ha investigado como marcador de actividad en otras enfermedades inmunológicas es la IL - 18. Esta citocina fue originalmente identificada como factor inductor de IFN-γ. Es una citocina proinflamatoria de 18.3 kD que fue aislada por primera vez del hígado de ratones con choque tóxico. [75] Se sintetiza como una molécula precursora (pro-IL-18) desprovista de una secuencia y requiere de una enzima convertidora IL-1b protein-cinasa intracelular, también conocida como caspasa-1, que desdobla a la molécula precursora en un péptido maduro.[76]

La IL-18 es secretada por las células de Kupfer y los macrófagos activados, [77] y tiene una capacidad similar que la IL-12 para inducir la producción de IFN-gamma en células T activadas y en células NK. La IL-18 incrementa la expresión del ligando Fas en los linfocitos T activados y células NK, [78] e induce apoptosis a través de un mecanismo de la vía Fas-FasL, además incrementa la expresión de ICAM-1, [79] que juega un papel central en la respuesta inmune mediada por células y en la eliminación de microorganismos invasores. Kohka y col, [79] reportaron que la IL-18 incrementa la expresión de ICAM-1 en una línea celular de mielomonocitos humanos (células KG-1) por una vía independiente de IFN gamma.

La IL-18 favorece la diferenciación de las células Th-1 en combinación con IL-12, induciendo la producción de IFNγ. También induce síntesis de FNTα, IL-1, ligando Fas y algunas quimiocinas. [80]

La IL-18 tiene algunas implicaciones clínicas en la modulación de tumores, infecciones y en las enfermedades autoinmunes e inflamatorias. [81] Se han demostrado concentraciones elevadas de IL-18 en pacientes con rechazo a injerto después del trasplante de médula ósea, [82] en neoplasias hematológicas, [83] así como en sepsis. [84] En pacientes con disfunción hepática antes de la hepatectomía y en enfermedades inflamatorias hepáticas también se han encontrado altas concentraciones séricas de IL-18, [85] al igual que en el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, [86-87] en la infección por virus de inmunodeficiencia humana, [88] en enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, [89] en la enfermedad inflamatoria inespecífica intestinal, [90] y durante el trabajo de parto y asociada a las complicaciones del embarazo. [91]

La IL-18 se ha utilizado como marcador de actividad de algunas enfermedades que pueden o no tener afección cutánea, entre las que se encuentran: el lupus eritematoso sistémico, [92] psoriasis, [93] enfermedad de Behcet, [94] sarcoidosis, [95] tuberculosis, [96] dermatomiositis, síndrome Sicca, esclerodermia, enfermedad mixta de tejido conectivo, [97] colitis ulcerosa, [98] infección por VIH/SIDA, [99] enfermedad injerto contra huésped [100] y dermatitis atópica. [101]

La presencia de altas concentraciones de IL-18 en estas enfermedades habla de una marcada participación de la respuesta Th1, reflejando que el queratinocito participa activamente en el desarrollo de esta inmunidad.

La IL-18 tiene una gran variedad de funciones biológicas. Se ha encontrado una función pleiotrópica, ya que puede desempeñar un papel regulador en la inmunidad humana, especialmente en las enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunes. También promueve la angiogénesis y la supresión de tumores.

Estudios como el de Naik y col, [102] observaron que el queratinocito, bajo un estímulo lesivo, es una fuente muy importante de RNAm IL-18 y que es poco expresado en las células endoteliales, fibroblastos y melanocitos.

DESARROLLO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

Planteamiento del problema.

El PV es una enfermedad ampollosa crónica de la piel de curso incierto, muchas veces relacionado a la respuesta a los esteroides sistémicos, el principal tratamiento, y que puede ocasionar una mortalidad de hasta un 15 a 20% en países que no cuentan con instalaciones adecuadas para el manejo de la enfermedad, como una sala de quemados o con los recursos farmacológicos necesarios para el control hospitalario de la enfermedad.

Los anticuerpos contra la desmogleína 3 son un recurso útil para monitorear la actividad del pénfigo vulgar, inclusive antes de que las lesiones se manifiesten clínicamente, sin embargo, el reactivo es difícil de adquirir por la mayoría de los centros hospitalarios que dedican parte de sus esfuerzos al manejo del PV, es costoso y la mayoría de las veces solo se encuentra disponible para fines de investigación. Hasta el momento actual, no existe otro estudio que haya mostrado utilidad para monitorear y predecir el daño epidérmico en la enfermedad.

La IL-18 es una citocina aparentemente involucrada en la patogenia del pénfigo vulgar al momento de intervenir en el proceso de inflamación, lo que conduce finalmente al desarrollo de apoptosis (que produce citolisis, que es una causa de acantolisis), y a la formación de autoanticuerpos (que también inducen la acantolisis con formación de una ampolla intraepidérmica).

Pregunta de investigación.

¿Tiene la interleucina 18 potencial para constituir un marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar?

Justificación.

El pénfigo vulgar es una enfermedad que afecta áreas variables de piel y mucosas, con períodos de brotes y remisiones.

El tratamiento básico consiste en la aplicación oportuna de dosis variables de corticosteroides. Sin embargo, no existen esquemas para determinar el momento oportuno de disminuir o aumentar las dosis y reducir el área de piel y mucosas dañadas

Los niveles de anticuerpos anti-desmogleína 3 constituyen un marcador confiable de la extensión del daño a piel y mucosas, e incluso se ha propuesto como predictor para determinar la necesidad de aumentar la dosis de corticosteroide

El costo y la dificultad para realizar la prueba anterior, hacen prácticamente inaccesible esta prueba para los pacientes con PV en México

La interleucina L18 podría constituir un marcador adecuado de la extensión del daño.

En piel y mucosas y probablemente un predictor de daño, cuya prueba sería más accesible a la población mexicana con PV.

Objetivos.

General

Evaluar el potencial de los niveles plasmáticos de Interleucina 18 como marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar

Específico.

1.- Analizar los niveles plasmáticos de IL-18 en pacientes sanos.

2.- Analizar los niveles plasmáticos de IL-18 en pacientes con PV y su correlación general con la extensión del daño en piel y mucosas (*Pemphigus Area and Activity Score*).

3.- Analizar la posible existencia de alguna correlación que permita anticipar el daño futuro a piel y mucosas.

Hipótesis.

La Interleucina 18 tiene potencial para constituir un marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar.

Diseño del estudio.

Estudio observacional, analítico, prospectivo, longitudinal.

Material y métodos.

Población.

Se estudiaron pacientes con pénfigo vulgar registrados en la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México con o sin manejo para la enfermedad, que sean ambulatorios u hospitalizados.

Lugar y duración.

La selección de pacientes se realizó en el Servicio de Dermatología del Hospital General de México, mientras que el procesamiento de las muestras para determinación de IL-18 y anticuerpos anti-Dsg3 se realizó en el departamento de Inmunología de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México y en el departamento de Inmunología del Instituto de Referencia Epidemiológica, durante el periodo del primero de junio del 2006 al 28 de febrero del 2007, con una duración de 8 meses. El costo del análisis de las muestras de plasma fue cubierto en su totalidad por los investigadores del estudio.

Plan de análisis.

Se representaron mediante gráficas las concentraciones de IL-18, así como parámetros demográficos. Para determinar si existe correlación entre los niveles plasmáticos de IL-18 y la severidad clínica del pénfigo vulgar, se realizó un coeficiente de correlación de Pearson.

Método de muestreo.

Se establecieron los siguientes criterios de selección:

Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico de pénfigo vulgar basado en criterios clínicos, histológicos e inmunológicos.
- Sexo masculino o femenino.
- Sin tratamiento para la enfermedad al menos 1 mes antes del estudio.
- Con consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

Criterios de no inclusión.

- Presencia de otras enfermedades autoinmunes.
- Presencia de sepsis.

Criterios de exclusión.

- Muerte del paciente después del primer mes de ingresado en el estudio.
- Desarrollo de sepsis después del primer mes de ingresado al estudio.
- Retiro del consentimiento por parte del paciente o representante legal después del primer mes de iniciado el estudio.

Criterios de eliminación.

- Muerte del paciente en el primer mes de ingresado en el estudio.

- Desarrollo de sepsis en el primer mes de ingresado al estudio.
- Retiro del consentimiento informado en el primer mes de tratamiento.

Definición de variables.

Concentraciones plasmáticas de IL-18

- *Categoría:* cuantitativa.
- *Escala de medición:* continua, de razón.
- *Unidad de medición: pg*/mL
- *Operacionalización:* La determinación de IL-18 se realizó por medio de la técnica de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales.

Severidad mucocutánea del Pénfigo vulgar

- Categoría.- Cuantitativa.
- Escala de medición.- Discreta
- Unidad de medición.- Unidades (índice).
- Operacionalización.- La severidad se evaluó por medio de la aplicación del Índice de Área y Severidad del Pénfigo (PAAS), aplicado al inicio del estudio, obteniéndose un rango (gradiente de severidad menor a mayor) que va de 0 a 60 unidades (puntos) (Valores menores de 20 son un grado leve, de 20 a menos de 40 son moderados y mayores de 40 severos.

Marcadores Clínicos	Valores Clínicos						
	0	1	2	3	4	5	6
A. Actividad							
a. No. De nuevas ampollas/día	0	1-5	6-10	11-20	>20		
b. Extensión periférica de ampollas existentes	ND	Leve	Moderado	Extenso			
c. Signo de Nikolsky	Positivo	Perilesional	Distante				
B. Área (%)	ND	1-15	16-30	31-50	51-70	71-90	>90

Puntaje de Cabeza (C).- (a+b+c) x puntaje de área x 0.1

Puntaje de Tronco (T).- (a+b+c) x puntaje de área x 0.3

Puntaje de Miembros superiores (S).- (a+b+c) x puntaje de área x 0.2

Puntaje de Miembros inferiores (I).- (a+b+c) x puntaje de área x 0.4

Puntaje Cutáneo total (CT).- C + T + S + I.

Marcadores Clínicos	*Valores Clínicos*			
	0	1	2	*3*

A. Área	ND	Un sitio	Dos sitios	*>2 sitios*
B. Severidad	*ND*	*Leve*	*Moderado*	*Severo*

Puntaje de Membrana Mucosa (M).- Puntaje de Área + Puntaje de Severidad

Puntaje Total.- CT + M

Agarwal M. Pemphigus area and severity score (PAAS) – a novel clinical scoring method for monitoring of pemphigus vulgaris patients. *Int J Dermatol* 1998; 37: 158-60

Otras variables a controlar.

Edad del paciente.

- *Categoría:* cuantitativa.
- *Escala de medición:* continua, de razón.
- *Unidad de análisis:* años.
- *Operacionalización:* Se catalogó como edad a los años cumplidos al momento de iniciado el estudio.

Sexo (Género) del paciente.

- *Categoría:* cualitativa.
- *Escala de medición:* nominal (dicotómica)
- *Unidad de análisis:* sexo masculino o femenino.
- *Operacionalización:* Se catalogó como sexo o género del paciente al fenotipo observado.

Utilización de esteroides sistémicos.

- *Categoría:* cualitativa.
- *Escala de medición:* nominal.
- *Unidad de análisis:* dicotómica.
- *Operacionalización:* Se considera como el uso de esteroides sistémicos (orales) durante el estudio. La dosis basal de esteroide oral no se modificó durante todo el estudio.

Tamaño de la muestra.

Al no tener valores aproximados de IL-18 en población mestiza, ni en pacientes con PV, no fue posible utilizar en ese momento una comparación de dos medias, por lo que se utilizó una fórmula para estimación de proporciones.

Se aplicó dicha fórmula considerando una probabilidad de aumento en las concentraciones de IL-18 en 75% de los pacientes con Pénfigo vulgar y en un 25%

de los controles sanos; con un valor β de 10% y un valor α de 5%. Estimando lo siguiente:

P1= 75%, 0.75.

P2= 25%, 0.25.

$Z\alpha$= 1.96 (0.05)

$Z\beta$= 1.28 (0.1)

$$n = \frac{[Z\alpha \sqrt{[2.P_2(1-P_2)] - Z\beta \sqrt{[P_1 .(1-P_1) + P_2 (1-P_2)]^2}}{(P_1 - P_2)}$$

$$n = \frac{1.96 \sqrt{[2 (0.25)(1-0.25)] - (- 1.28) \sqrt{[0.75 (1-0.75) + (0.25 (1-0.25)]]^2}}{(0.75-0.25)^2}$$

$$n = \frac{(1.20024997 + 0.783836718)^2}{0.25}$$

$$n = \frac{3.93659995}{0.25}$$

n = 15.74 = 16 sujetos por grupo (con la enfermedad y en sujetos sanos)

Los resultados obtenidos de dicha comparación son los siguientes:

Los valores de IL-18 se encontraron en el orden de 50.4 ± 25.89 *pg*/mL (15-99 *pg*/mL) en sujetos sanos. En pacientes con pénfigo vulgar, se observaron valores de 175.15 ± 110.62 *pg*/mL (38-475 *pg*/mL). La comparación estadística en estos grupos por la prueba de Mann-Whitney mostró diferencias estadísticamente significativas (*p*= 0.001).

Al conocerse el valor de la varianza de la distribución de la variable de respuesta en el grupo de referencia y decidir la mínima diferencia que se consideró de relevancia clínica y que fue capaz de detectarse, se fijaron los grados de error α y β y se procedió a utilizar la fórmula de comparación de dos medias.

La fórmula a aplicar fue la siguiente: $n= 2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2/d^2$, en donde *n* es el número de sujetos necesarios en cada uno de los grupos, $Z\alpha$ es el valor de Z correspondiente al riesgo α fijado y $Z\beta$ el del riesgo β fijado. Se consideró como S^2 a la varianza de la distribución de la variable cuantitativa que aparentemente existe en el grupo control (de referencia) y d^2 al valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

n= número de sujetos necesarios por grupo.

$Z\alpha$= valor de Z en relación al riesgo α fijado (1.96, α 0.05).

$Z\beta$= valor de Z en relación al riesgo β fijado (0.842, β 0.2).

S^2= varianza de la distribución de la variable cuantitativa que se supone que existe en el grupo de referencia ($S^2= (404.3517)^2$).

d^2= valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (359.2 *pg*/mL).

Sustituyendo:

$n= 2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2/d^2$

n= 2 (1.96 + 0.842)2 (404.3517)2 / (359.2)2

n= 2567348.419 / 129024.6

n= 19.898 = 20

n= 20 sujetos + 15% de perdidas en seguimiento.

En total se seleccionaron 33 pacientes con PV de manera no aleatoria y en base a tamaño de muestra. Los pacientes seleccionados cubrían los criterios de selección y tenían registro como pacientes en la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México.

Método de muestreo.

No probabilístico, de casos consecutivos que cumplieron con los criterios de selección, hasta alcanzar el tamaño de la cohorte que constituyó una muestra de pacientes con diagnóstico por criterios clínicos, histológicos e inmunológicos del pénfigo vulgar.

Descripción operativa del estudio.

Se efectuó un estudio preliminar para determinar el potencial de los niveles plasmáticos de Interleucina 18 como marcador y predictor de daño epidérmico en

pacientes con pénfigo vulgar. La toma de muestra de plasma fue mensual en 3 determinaciones incluyendo la basal.

1. El paciente fue seleccionado de la consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital General de México en base a criterios de selección.
2. Al considerar al paciente como apto para el estudio, se procedió a entrevista dirigida donde se interrogó acerca del consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo 1) y para la toma de la muestra de sangre de 5mL.
3. Se requirió interrogatorio y exploración física dirigida (Anexo 2).
4. La toma de muestra de sangre de 5mL se realizó de manera aséptica (Anexo 3).
5. La muestra se centrifugó antes de transcurrir una hora y se conservó el plasma en criotubos de 3mL a temperaturas de entre -20 y -30º C.
6. La determinación de las concentraciones de IL-18 presente en plasma se realizó por el método de ELISA con placas recubiertas con anticuerpo monoclonal de ratón específico para IL-18.

Determinación de IL-18 plasmática.

1. Las concentraciones de la IL-18 se determinaron del plasma de sangre obtenida por punción periférica al momento de aceptar el paciente participar en el estudio.
2. El volumen de sangre que se obtuvo fue de 3mL, la cual se depositó en tubos con EDTA (tubo de biometría hemática), se centrifugó y el plasma se almacenó en tubos de polipropileno (criotubos) a -20 a -30º C hasta que se efectuó su análisis.
3. Se utilizaron equipos de ELISA específicos MBL (Medical and Biological Laboratories) CO, LTD que tenían microplacas con

anticuerpos monoclonales con anti-IL-18 marcados con peroxidasa como anticuerpos de detección para esquema de captura (*sándwich* ó emparedado) (cada microplaca contiene 96 pozos).

4. Las lecturas se hicieron en un lector automático marca Organón Teknika Reader, modelo 230-S versión 1.23.
5. Previo a la aplicación del plasma de los sujetos del estudio, se calibró el equipo con un calibrador liofilizado de IL-18 humana.
6. Ya calibrado el equipo, se aplicó plasma de cada uno de los sujetos del estudio en los pozos, se incubó y posteriormente se lava y se adiciona el reactivo conjugado (anti-IL-18 humana conjugado con peroxidasa) y se incuba nuevamente (1hr a 20-25º C).
7. Posterior a la segunda incubación, se aplicó una solución ácida a cada pozo para detener la reacción enzimática y estabilizar el color desarrollado.
8. Se utilizó un lector de microplaca para medir la densidad óptica de cada pozo a 450nm.
9. La concentración de IL-18 se determinó por medio de una curva de concentración, basándose en estándares de referencia.
10. La lectura de la absorbancia se efectuó dentro de los primeros 30 minutos de haberse detenido la reacción.

Aspectos éticos.

La investigación fue clasificada como de riesgo mínimo, ya que la toma de la muestra de sangre periférica se efectuó de acuerdo a las normas vigentes de asepsia y antisepsia para evitar contaminantes. El estudio en general fue aprobado por el Comité de Investigación el 21 de junio del 2006 con número de oficio CI/06/098 y por el Comité de Ética del Hospital General de México el día 05 de julio del 2006 con número de oficio CE/06/228.

Se solicitó consentimiento informado por escrito al paciente o responsable legal.

Resultados.

Pacientes.

Los datos de los pacientes se exponen en la tabla 1.

	Número de pacientes (%)		**Valor de *p***
Variables	Pénfigo vulgar n= 33	Sanos n= 15	
Sexo			
Masculino	14 (42)	6 (40)	
Femenino	19 (58)	9 (60)	
Edad (años)			
Media DE	30.80 ± 7.97	30.36 ± 6.59	0.852
Rango	20-45 años	20-45 años	
Severidad de enfermedad			
SCA	42.5 ± 22.3		
PAAS	29.27 ± 12.16		
Niveles de IL-18			
IL-18 (pg/mL)	206.45±154.76	99.07±49.13	0.012

Tabla 1. Datos demográficos y clínicos de la muestra estudiada.

Se estudió un total de 48 sujetos, 15 sujetos sanos y 33 con pénfigo vulgar de reciente diagnóstico y aun sin tratamiento sistémico. Los promedios de edad fueron 30.36 ± 6.59 (20-45 años) en el grupo de sujetos sanos y 30.80 ± 7.97 años (20-45 años) en el grupo con la enfermedad.

El tratamiento asignado a los pacientes con pénfigo vulgar fue con prednisona a dosis de 0.5 a 1mg/kg/día, de acuerdo a severidad clínica, por el tiempo de seguimiento del estudio (3 meses), sin modificar la dosis basal.

Ningún paciente presentó datos de infección a nivel de piel ni a nivel de vías urinarias y respiratorias, sin embargo a todos se les inició una dosis empírica de

ceftriaxona 1gr dosis única. No se utilizaron adyuvantes o ahorradores de esteroides dentro del tiempo de seguimiento.

Concentraciones séricas de IL-18 en sujetos sanos.

Los valores de IL-18 se encontraron en el orden de 99.07 ± 49.13 *pg*/mL (23-195 *pg*/mL) en sujetos sanos. En los sujetos sanos se observaron valores relativamente altos de IL-18 con una gran variabilidad (Fig 2).

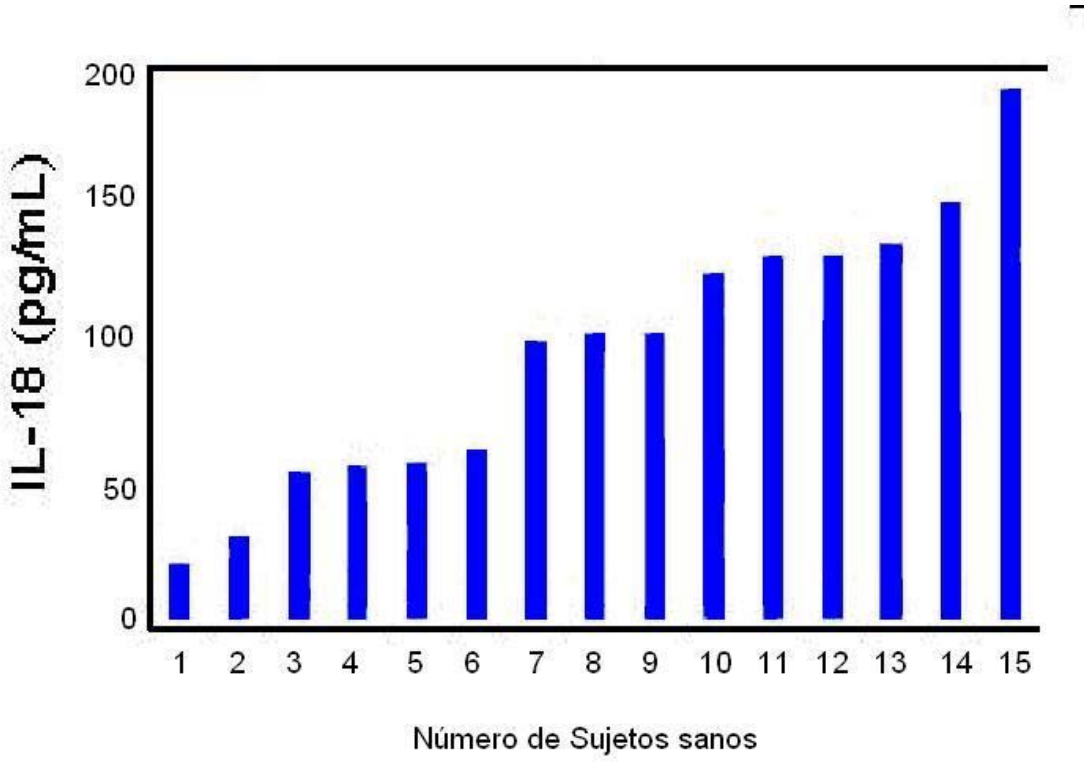

Fig 2. Valores de IL-18 de sujetos sanos.

Al hacer la correlación de los niveles de IL-18 en pacientes sanos con la edad y el género de los mismos, observamos que tal correlación es poco probable (Fig 3).

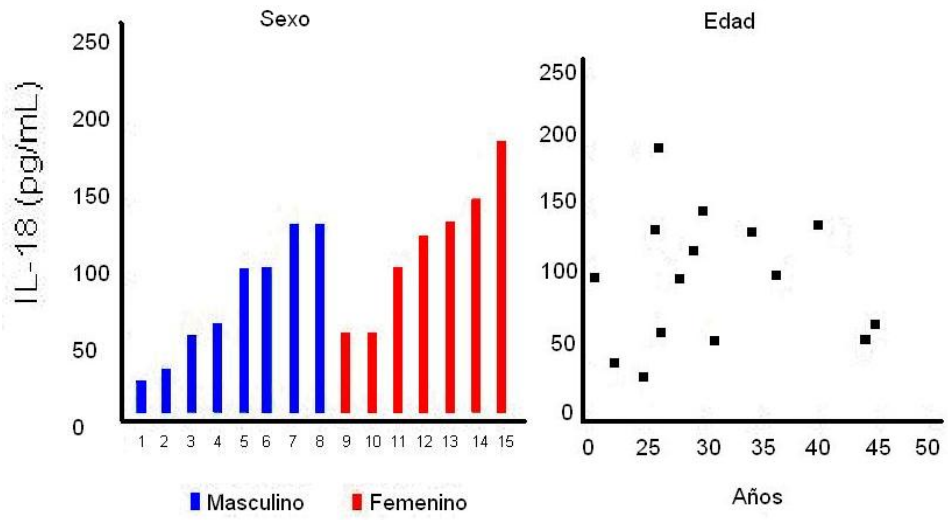

Fig 3. Relación de la IL-18 con la edad y el sexo de sujetos sanos.

Concentraciones séricas de IL-18 en pacientes con pénfigo vulgar.

En pacientes con pénfigo vulgar, se observaron valores de 206.45 ± 154.76 *pg*/mL (15-657 *pg*/mL) (Fig 4). Observamos que los niveles de IL-18 son similares a los de los sujetos sanos, aunque algunos sujetos con la enfermedad presentan niveles marcadamente elevados.

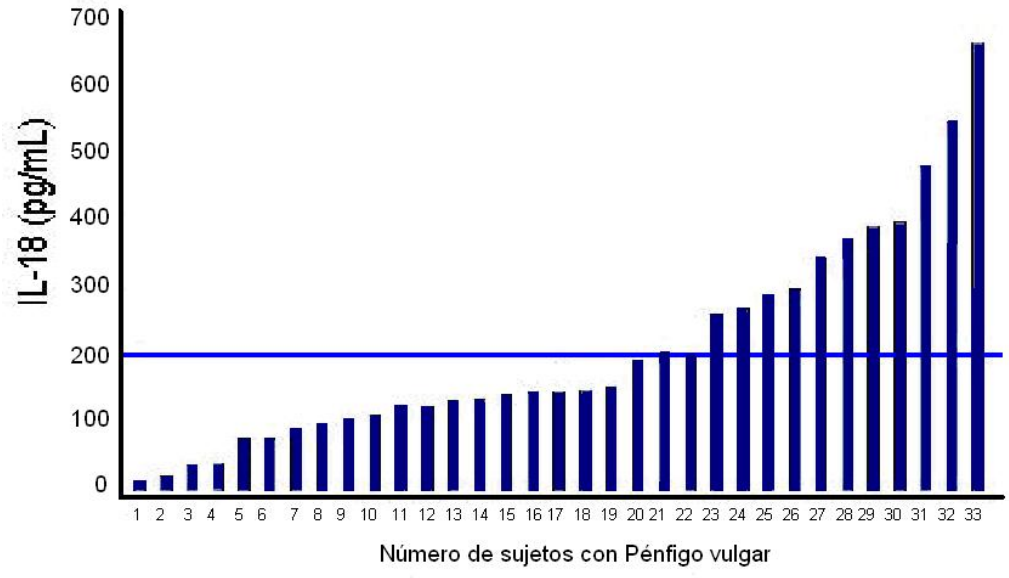

Fig 4. Valores de IL-18 en PV.

Siguiendo la tendencia anterior de los datos, no parece existir una relación entre los niveles de IL-18 y el género (Fig 5).

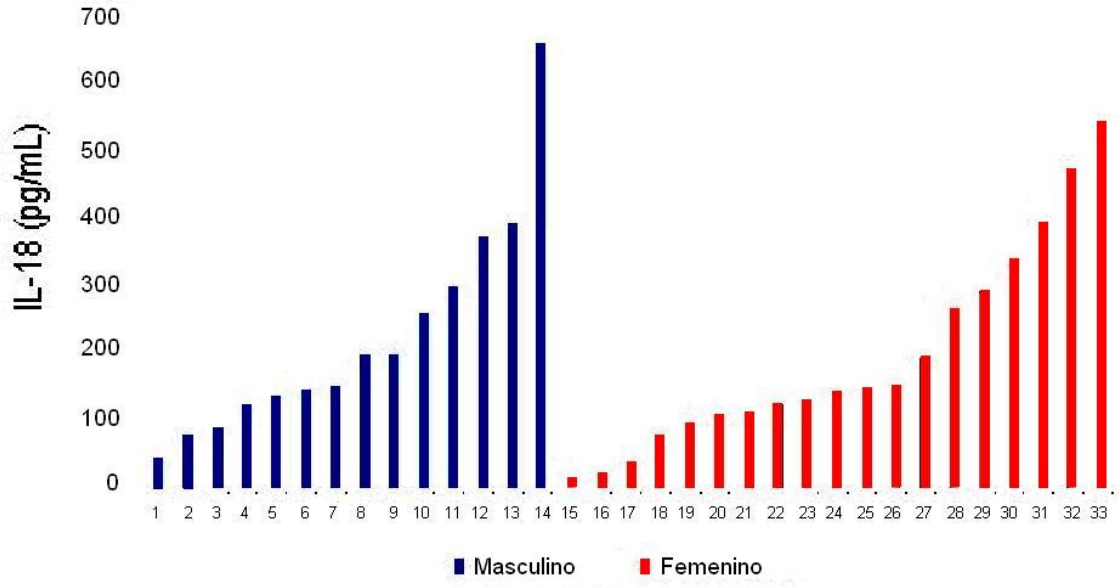

Fig 5. Relación de la IL-18 con el sexo en PV.

Al hacer lo mismo con la edad, de igual manera no encontramos relación con los niveles de IL-18 (Fig 6).

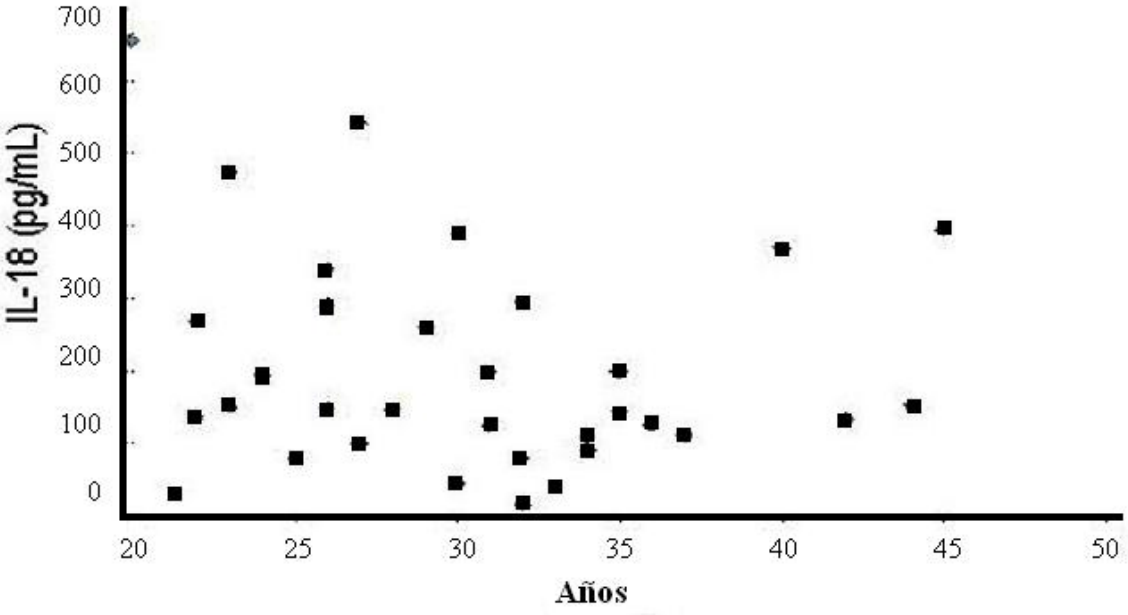

Fig 6.- Relación de la IL-18 con la edad en años en PV.

Relación entre niveles de IL-18 y Superficie corporal afectada.

Al hacer la correlación entre los niveles de IL-18 y la superficie corporal afectada en PV, se encuentra una adecuada correlación entre dichos parámetros. Curiosamente, la división por 7 de los niveles de IL-18 correlaciona bien con el área dañada (Fig 7).

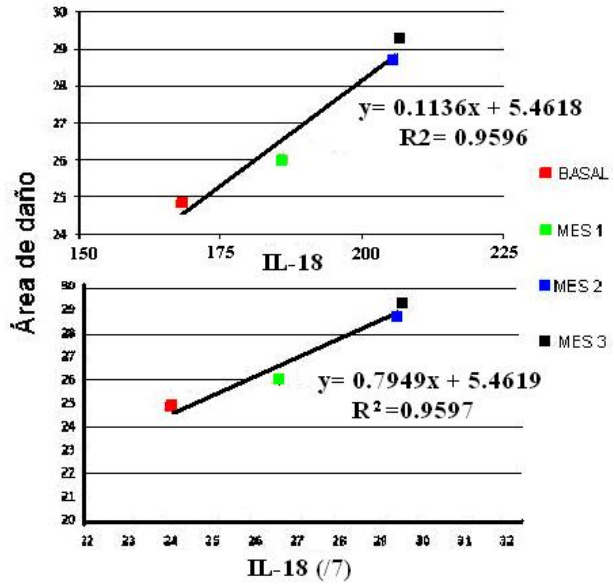

Fig 7. Correlación entre los niveles de IL-18 y la superficie corporal afectada en PV.

Para el procesamiento de los datos, se dividieron arbitrariamente los sujetos, de acuerdo a intervalos (0-99, 100-199, 200-299, ≥300) en los valores de IL-18 (Tabla 2).

Intervalo IL 18	**No Sujetos PV**
0 -99	8
100 – 199	14
200-299	4
> 300	7
TOTAL	**33**

Tabla 2. Estratificación de los valores de IL-18 en PV.

Al hacer la correlación por intervalos, se muestra una correlación promedio aceptable con la extensión de piel y mucosas dañadas, encontrándose que a mayor nivel de IL-18, mayor daño en la piel (Fig 8).

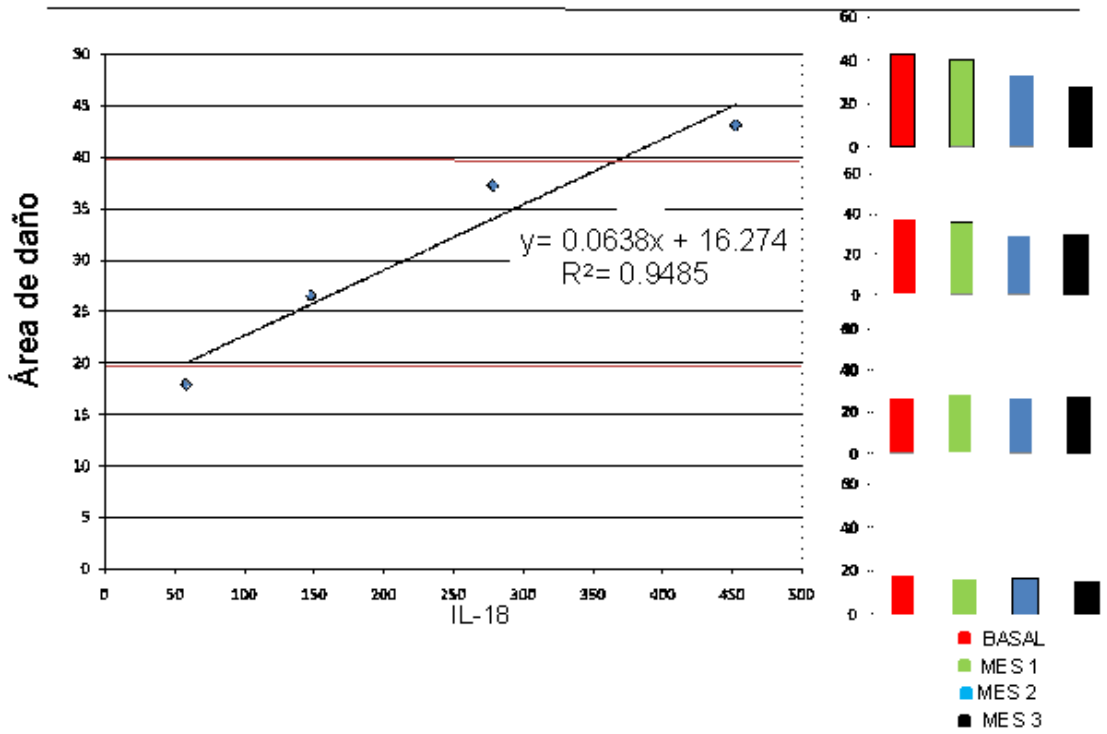

Fig 8. Correlación por intervalos de la IL-18 con severidad cutánea. Las líneas rojas separan el daño cutáneo en leve, moderado y severo. A la derecha se presenta el pronóstico por extensión de daño cutáneo mensual.

Si el objetivo del tratamiento fuera tener al paciente debajo de 20, parecería clara la necesidad de aumentar la dosis de corticosteroides en los pacientes con IL-18 > 99.

Sin embargo, esto es promedio, ¿habrá un predictor mejor?, ¿será la tendencia a subir o bajar los niveles de IL-18 durante el primer mes, respecto al valor basal, un buen predictor de daño futuro que nos permita ajustar la dosis de corticosteroide u otro tratamiento?.

Para responder esto, determinamos el agravamiento del PV por la tendencia de la IL-18 basal y al primer mes (Fig 9).

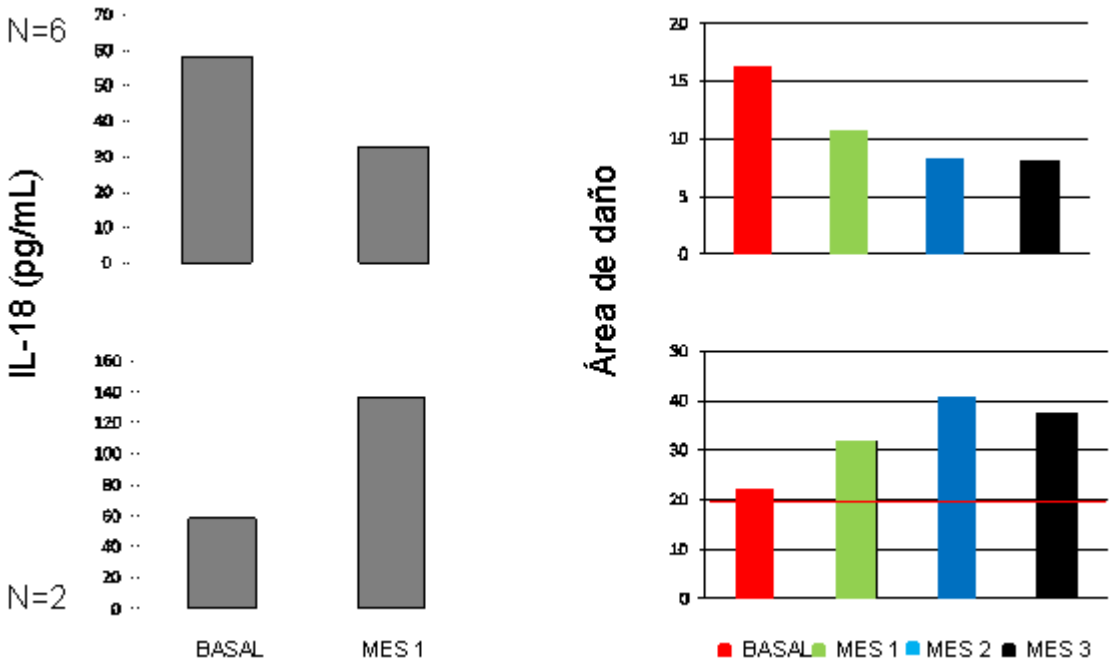

Fig 9. Agravamiento del PV en relación a la tendencia de IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de 0-99 pg/mL).

Observamos que en los pacientes con IL-18 <100 que baja, la respuesta al tratamiento inicial es buena, no teniendo necesidad de ajustar dosis de esteroide o agregar adyuvante, mientras que en los pacientes que sube, hay necesidad de aumentar la dosis de esteroide oral o agregar un adyuvante.

En los pacientes con IL-18 en valores de 100 – 199pg/mL que tienden a bajar, la respuesta al tratamiento es buena, pudiendo incrementar la dosis de esteroide para intentar una respuesta más rápida. Por otra parte, en los pacientes que sube, observamos mala respuesta al tratamiento, por lo que es necesario incrementar la dosis de esteroide y/o agregar un adyuvante (Fig 10).

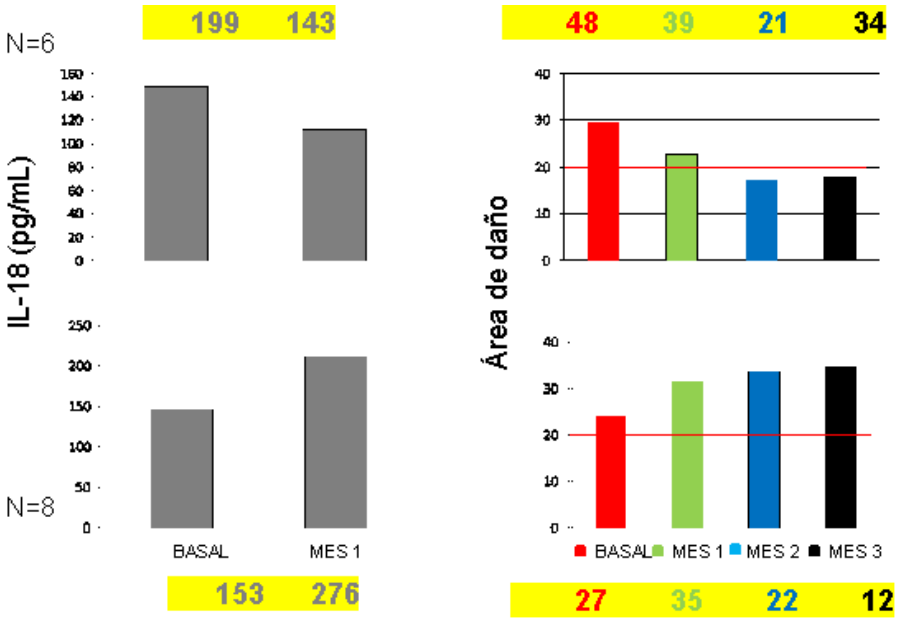

Fig 10. Agravamiento del PV en relación a la tendencia de IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de 100-199 pg/mL).

En los pacientes con IL-18 con valores de 200 – 299pg/mL que tienden a bajar, la respuesta al tratamiento es buena, pudiendo incrementar la dosis de esteroide para acelerar la respuesta al esteroide. En los pacientes en donde la IL-18 sube, es necesario incrementar la dosis de esteroide y agregar un adyuvante (Fig 11).

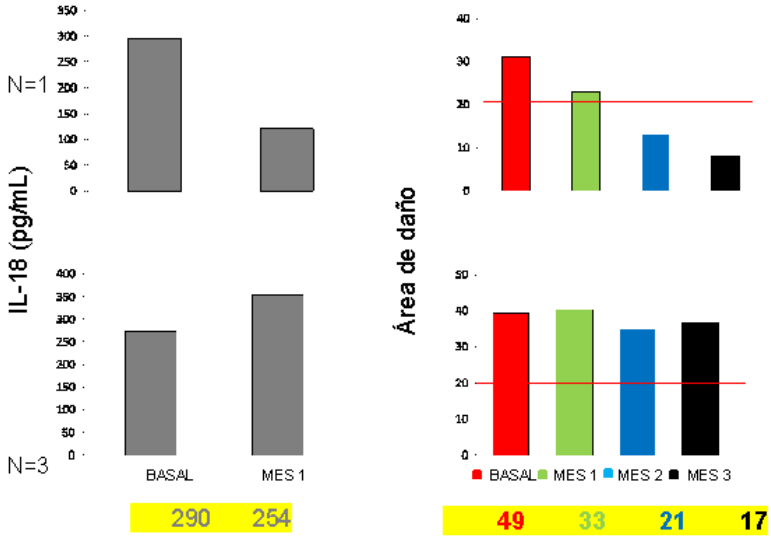

Fig 11. Agravamiento del PV en relación a la tendencia de IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de 200-299 pg/mL).

En los pacientes con IL-18 con valor >299 que tiende a bajar en el primer mes, la respuesta al tratamiento es mejor, aunque requiere ajuste de la dosis de esteroide oral. En los pacientes en donde los valores de IL-18 se incrementan, la respuesta al tratamiento es mala, por lo que es necesario aumentar la dosis de esteroide oral y agregar un adyuvante (Fig 12).

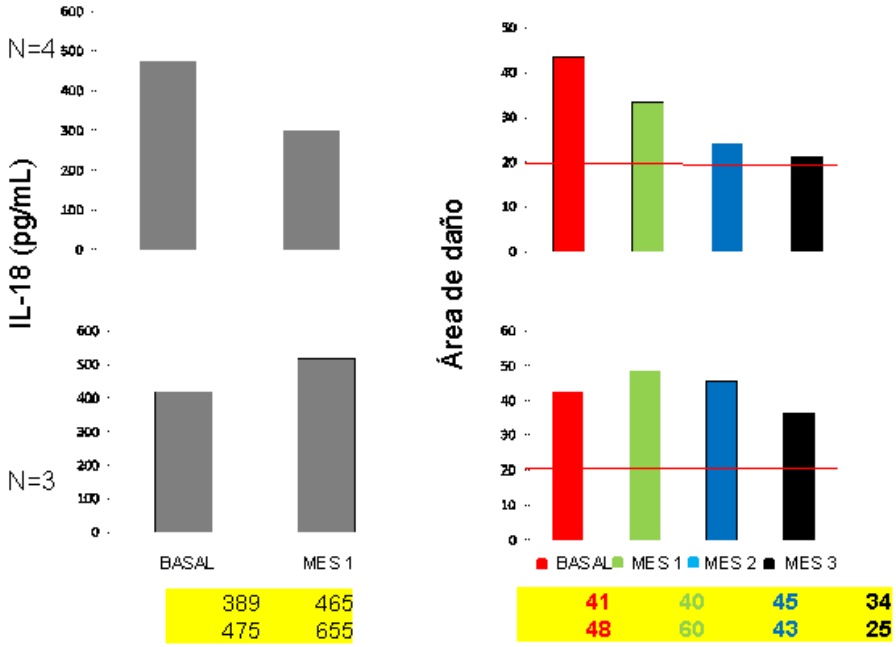

Fig 12. Agravamiento del PV en relación a la tendencia de IL-18 basal al primer mes (valores de IL-18 de >299 pg/mL).

Discusión.

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad ampollosa autoinmune (PV), que en la actualidad condiciona altos índice de morbi-mortalidad anualmente, motivo por el que se debe de contar con las herramientas necesarias para evitar dichos eventos. Para tales fines es de vital importancia contar con recursos accesibles que permitan al médico un eficaz control de la enfermedad. [4]

En el PV se rompe el equilibrio de la respuesta inmunológica, la que tiene por finalidad, de manera habitual, el reconocimiento de agentes externos y montar una respuesta sea de tipo celular, humoral y/o combinada para preservar la homeostasis del organismo; se ha visto a través de estudios experimentales que al desestabilizarse esta armonía pueden generarse procesos autoinmunes en los que están involucrados de manera importante los linfocitos T, dilucidando de tal manera la serie de mecanismos relacionados, los cuales siguen en estudio y aun no se ha determinado con certeza el papel que juegan la inmunidad Th1 y Th2, así como la interrelación de las citocinas derivadas de ambas líneas. [4]

Es de relevancia destacar las líneas de investigación que describen los mecanismos fisiopatogénicos de algunas enfermedades que se caracterizan por compartir un fondo inmunológico común, principalmente condicionado por la respuesta tipo Th-1, que conlleva a la cascada inmunológica responsable de la generación de los autoanticuerpos que condicionan el daño directo observado. [4,12]

Dentro de los procesos involucrados en el desarrollo de la enfermedad solamente se han dilucidado algunos de ellos y dentro de estos se sabe que la susceptibilidad genética condiciona una desregulación inmunológica que aunada a otros procesos multifactoriales son los responsables del desencadenamiento y mantenimiento de la entidad, siendo así que la liberación de las citocinas involucradas, objeto de nuestro estudio, preceden a las manifestaciones clínicas.

Es bien sabido que la IL-12 es una de las principales citocinas implicadas en el daño tisular en enfermedades autoinmunes y parece ser uno de los productos esencialmente involucrados en la inducción eficaz de la inmunidad Th1. [80]

Recientemente se ha aceptado que la IL-18 acelera la enfermedad autoinmune, actuando de manera sinérgica con la IL-12, incrementando recíprocamente la

expresión de sus receptores y de los niveles de IFN-γ. Los efectos de la IL-18 en el desarrollo de la enfermedad autoinmune se incrementan al reducir los niveles de IL-10, principal promotor de la inmunidad Th2, la cuál se conoce que tiene efectos antiinflamatorios. En tales procesos inmunológicos, se implican una gamma de órganos afectados y la IL 18 se ha utilizado en algunas entidades como un marcador certero de actividad, deterioro y/o evolución en ciertos padecimientos, lo que va directamente relacionado a la oscilación de dicha citosina, de ahí que al monitorizar la IL 18 pueda reflejar la actividad del pénfigo vulgar, ya que es responsable de favorecer la preservación del proceso auto-inmune al generar IFN-γ, FNT α, IL-1 y otras quimiocinas, aumentar la expresión del ligando *Fas* en los linfocitos T activados y células NK, inducir apoptosis a través de un mecanismo de la vía *Fas-FasL*, además de que favorece la expresión de ICAM-1, que juega un papel central en la respuesta inmune mediada por células y en la eliminación de microorganismos invasores, así como la diferenciación de las células Th-1 en combinación con IL-12. [76,79,80]

La presencia de altas concentraciones de IL-18 en estas enfermedades habla de una marcada participación de la respuesta Th1, reflejando que el queratinocito participa activamente en el desarrollo de esta inmunidad, ya que al encontrarse bajo un estímulo lesivo, se convierte en una fuente muy importante de RNAm IL-18. [81]

Determinar la actividad de una enfermedad autoinmune resulta difícil ya que es el resultado de numerosos procesos inmunológicos siendo complicado saber con precisión si un determinado factor es importante o no en la patogenia de la enfermedad. No obstante, la IL-18 se ha utilizado con gran éxito para monitorizar la actividad de un sin número de enfermedades autoinmunes, aunque nunca en el PV, y mucho menos que se utilice para normar una conducta terapéutica en una enfermedad de difícil respuesta incluso a los esteroides orales.

Es propio en este momento establecer que en el estudio, la IL-18 no solo se elevó considerablemente en la enfermedad, sino que correlacionó con la severidad de la misma y permitió establecer puntos de corte para modular el régimen terapéutico a seguir, motivo de un estudio futuro.

Cabe mencionar, sin embargo que el estudio tuvo algunas limitaciones que es necesario considerar. Primero, las citocinas en el plasma pueden no reflejar las concentraciones tisulares, que pueden llegar a ser mucho más elevadas y no permitir evidenciar una relación clínica-laboratorial. Segundo, las citocinas en el plasma pueden estar unidas a proteínas, receptores o autoanticuerpos, lo que puede retrasar su aclaramiento. Tercero, el kit que utilizamos para medir los niveles plasmáticos de IL-18, nos proporciona los niveles de la citocina que se encuentra en forma libre y madura, sin embargo, no nos ofrece datos sobre los niveles de la Pro-IL-18, que es verdaderamente un inductor de la proteína *Fas* y sus niveles podrían apoyar para hacer un estudio de correlación entre los dos sustratos, sin embargo, para lo anterior se hubiera necesitado hacer la medición de la citocina en tejidos.

Dentro de lo destacable del estudio, además de lo anterior, fue determinar los niveles séricos normales de IL-18 en la población mexicana sana, ya que actualmente se desconocían dichos valores y a su vez estos comparados con los encontrados en los pacientes con pénfigo vulgar, donde encontramos diferencias significativas.

El encontrar correlación entre las dos variables más importantes del estudio (niveles de IL-18 y severidad clínica), nos permite concluir que la IL 18 es un marcador directo de la enfermedad ya que ésta puede condicionar acantolisis (signo histológico de actividad inmunológica en el PV) mediante varias vías, una de ellas es directamente sobre el desencadenamiento de la respuesta tipo Th1 y de esa forma activar el mecanismo inmunológico relacionado y ya conocido del PV; en segundo lugar puede producir apoptosis al incrementar la expresión del ligando *Fas* en los linfocitos T activados y células NK, [78] e inducir así la apoptosis a través de un mecanismo de la vía *Fas-FasL* [58] y por último induciendo la generación de anticuerpos antidesmogleina 3 (aDsg3), por lo que es sugerente que la actividad de la enfermedad pueda correlacionarse con los niveles tanto de IL-18 como de los anticuerpos aDsg, lo que puede ser de utilidad para el clínico para orientarlo durante el abordaje terapéutico del paciente. Es posible que los niveles de IL 18 sean de inicio más precoz que los anticuerpos aDsg, ya que en la

patogenia de la enfermedad, el primero puede considerarse una pieza fundamental para estimular al linfocito B a diferenciarse y generar anticuerpos específicos para desmogleína 3 y por tanto ser de mayor utilidad para el dermatólogo, proporcionando así una herramienta de carácter no invasiva, de bajo costo que permitirá al clínico la atención oportuna y eficaz de los pacientes con PV ante las exacerbaciones o recaídas de la entidad, reduciendo en consecuencia la morbi-mortalidad de estos pacientes.

Conclusiones.

1. La IL-18 se encuentra en mayores concentraciones en el PV que en sujetos sanos (sin enfermedad inmunológica).
2. Los niveles de IL18 sérica se correlacionan con la severidad clínica del pénfigo vulgar. El monitoreo de la misma proporciona una herramienta accesible, económica y fácil de realizar en un laboratorio de Inmunología.
3. Permite predecir la evolución de la enfermedad con lo que se pueden tomar conductas terapéuticas pertinentes.
4. Dicha medida reducirá brotes severos de la enfermedad y los costos de tratamientos innecesarios, que a su vez impactarán en los gastos hospitalarios y el índice de morbimortalidad de la entidad.

Referencias.

1. Holubar K. Historical background. In Wojnaronwska F, Briggman RA (eds); management of blistering diseases. London, Chapman and Hall Medical 1990: 1-12.
2. Jordon R. Pemphigus: A historical perspective. URL: www.pemphigus.org/amhistory.html.
3. De Sauvages FG. Nosología metódica sistens morburum clases, Vol. 1. Amsterdam, Frates de Tournes 1786; 430.
4. Tirado-Sanchez A. Treatment of pemphigus vulgaris. An overview in Mexico. Allergol Immunopathol 2006; 34: 10-6.
5. McBride D. A methodical introduction to the theory and practice of the art of medicine, 2d. Ed, Dublin, W Watson 1777: 239-492.
6. Lever WF. Savary's 1814 article on the historyof pemphigus related to contemporary views. Int J Dermatol 1979; 18: 584-5.
7. Holubar K. The influence of the Vienna School of Dermatopathology, Dermatopathology, Practical and conceptual 2000; 6: 65-70.
8. Level WF. Pemphigus. Medicine 1953; 32: 1-123.
9. Nikolsky PV. Inestability of the stratum corneum in relation to mechanical influences. Medicinskaja Mysl 1922; 2: 65-71.
10. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E. Basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid. JAMA 1967; 200: 751-6.
11. Anhalt GJ, Labib RS, Diaz LA, Beals TF, Voorhees JJ. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med 1982; 306: 1189-96.
12. Ryan JG. Pemphigus. Arch Dermatol 1971; 104: 14-20.
13. Pisanti S, Sharow Y, Kaufman E. Pemphigus vulgaris. Oral Surg 1974; 38: 382-7.
14. Bassam Z, Mohsin A, van Voorhees A. Pemphigus vulgaris. eMedicine 2003; 14: 1-14.
15. Paredes V. Los pénfigos en el Hospital General de México. Tesis de posgrado 2002.

16. Sinha AA, López MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases. Science 1990; 248: 1380-7.
17. Rodees DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. Rev Immunogenet 1999; 1: 21-31.
18. Mackay I, Rosen F. The HLA system. N Engl J Med 2000; 343: 782-6.
19. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA. MHC haplotypes. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5056-60.
20. Miyagawa S. HLA DRB1*04 and 14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among japanese. J Invest Dermatol 1997; 109: 615-8.
21. Vega-Memije ME, Saez de Ocaris MM, Cortés-Franco R, Domínguez-Soto L. Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. Gac Med Mex 2001; 137: 535-40.
22. Lin MS, Swart SJ, López A, Ding X. Fairley development and characterization desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol 1998; 110: 388-92.
23. Memar OM, Rady RM, Goldblum A, Yen S. Human herpesvirus 8 DNA sequences in blistering skin from patients with pemphigus. Arch Dermatol 1997; 133: 1247-51.
24. Ruocco V, Wolf Ron, Ruocco E, Baroni A. Viruses in pemphigus. Int J Dermatol 1996; 35: 782-4.
25. Friedmann PS, Lee MS, Friedmann AC. Mechanisms in cutaneous drug hypersensitivity reactions. Clin Exp Allergy 2003; 33: 681-2.
26. Matzner Y, Erlich HA, Brautbar C. Identical HLA class II alleles predispose to drug-triggered and idiophatic pemphigus vulgaris. Acta Derm Venereol 1995; 75: 12-4.
27. Davis D, Woodley D, Wells M, Miller J. Drug induced pemphigus. eMedicine 2001; 2: 1-10.
28. Ruocco V, de Angelis E, Lombardi ML. Drug induced pemphigus. Clin Dermatol 1993; 11: 507-13.
29. Tur E, Brenner S. Diet and pemphigus. Arch Dermatol 1998; 134: 1406-10.

30. Kyriakis K. Environmental factors influencing the biological behaviour of patterns of pemphigus vulgaris. Int J Dermatol 1995; 34: 181-5.
31. Fetell B, Roffman S. Cutaneous proteasa activity after ultraviolet radiation. J Invest Dermatol 1984; 76: 333.
32. Reis V, Toledo R, López A. UVB induced acantholysis in endemic pemphigus. J Am Acad Dermatol 2000; 42: 571-6.
33. Ivanov DB, Philliphova P. Structure and functions of classical cadherins. Biochemistry 2001; 66: 1174-1450.
34. Peñas PF, Garcia Diez A. Queratinocito. En: España Alonso, Quintanilla Gutierrez Eds, Fisiopatología de las Enfermedades Cutáneas III, Barcelona 2000; 287-314.
35. Wang Y, Amagai M, Minoshima S. The human genes for desmogleins. Genomics 1994; 40: 492-5.
36. Sekiguchi M, Futei Y. Dominant autoimmune epitopes. J Immunol 2001; 167: 5439-48.
37. Kljuic A, Bazzi H. A novel human desmosomal cadherin gene family member. Proceedings of the International Investigative Dermatology 2003; Miami Beach, Florida, USA.
38. Whittlock NV. Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six genes. J Invest Dermatol 2003; 120: 970-80.
39. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. J Am Acad Dermatol 2003; 48: 244-52.
40. Hashimoto K. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. J Exp Med 1983; 157: 259-72.
41. Mahoney MG, Hong Wang Z. Pemphigus vulgaris and foliaceous antibodies are pathogenic in plasminogen activator Knockout mice. J Invest Dermatol 1999; 113: 22-5.
42. Kitajima Y, Aoyama Y. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes. J Invest Dermatol Symp Proc 1999; 4: 137-44.

43. Kitajima Y. Current and prospective understanding of pemphigus. Arch Dermatol Res 2003; 295: S17-23.
44. Sekiguchi M, Futei Y. Dominant autoimmune epitopes in pemphigus. J Immunol 2001; 167: 5439-48.
45. Hacker M, Janson M, Fairley J, Lin M. Isotypes and antigenic profiles of pemphigus antibodies. Clin Immunol 2002; 105: 64-74.
46. Bhol K, Mohimen A, Ahmed A. Correlation of subclases of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. Dermatology 1994; 189: 85-9.
47. Coffman RL, Seymour WP. The role of Th cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. Immunol Rev 1988; 102: 5-28.
48. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A. Spreading of T cell autoimmunity to cryptic determinant of an autoantigen. Nature 1992; 358: 155-7.
49. Lin MS, Fu CL. Desmoglein 1 specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus. J Clin Invest 2000; 105: 207-13.
50. Rico MJ, Benning C. Characterization of skin cytokines in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. Br J Dermatol 1999; 140: 1079-86.
51. D'auria L, Bonifati C. Increased serum interleukin 15 levels in bullous skin diseases. Arch Dermatol Res 1999; 291: 354-6.
52. López-Robles E, Avalos Diaz E, Vega Memije E. TNFalpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. Int J Dermatol 2001; 40: 185-8.
53. Ameglio F, D'auria L, Cordiali Fei P. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. J Biol Regul Homeost Agents 1997; 11: 148-53.
54. Feliciani C. In vitro and in vivo expression of IL-1alpha and TNFalpha RNA in pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol 2000; 114: 71-7.
55. Bhol K, Rojas A, Khan I, Ahmed R. Pemphigus vulgaris , presence of IL-10. Cytokine 2000; 12: 1076-83.
56. Grossman J. Apoptotic signaling during initiation of detachment induced apoptosis. Cell Growth Diff 2001; 12: 147-55.
57. Frisch SM. Evidence for a function of death receptor related. Current Biol 1999; 9: 1047-9.

58. Sharma K, Wang RX, Zhang LV. Death, the Fas way. Pharmacol Ther 2000; 88: 333-47.
59. Puviani M, Marconi M. Fas ligand in pemphigus sera induces apoptosis with caspase 8. J Invest Dermatol 2003; 120: 164-7.
60. Weiske J. The fate of desmosomal protein in apoptotic cells. J Biol Chem 2001; 276: 41175-81.
61. Hale E. Laryngeal and nasal involvement in pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol 2001; 44: 609-11.
62. Pulido M. Inmunofluorescencia directa en piel en pénfigo en remisión. Tesis de posgrado 2000.
63. Lever WF. Enfermedades vesiculosas o ampollares no infecciosas. En: Lever WF ed, Histopatología de la Piel, 7ª Ed, Buenos Aires, Intermédica 1991; 117: 505-10.
64. Kanitakis J. Indirect immunofluorescence . Clin Dermatol 2001; 19: 614-21.
65. Amagai M. Autoantibodies against a novel epitelial cadherin in pemphigus vulgaris. Cell 1991; 67: 869-77.
66. Amagai M. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracelular domain of pemphigus vulgaris antigens. J Clin Invest 1994; 94: 59-67.
67. Ishii K, Amagai M. Characterization of autoantibodies in pemphigus. J Immunol 1997; 159: 2010-17.
68. Harman KE. Diagnosis of pemphigus by ELISA. Clin Exp Dermatol 2000; 25: 236-40.
69. Amagai M. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the antiDsg autoantibody profile. J Am Acad Dermatol 1999; 40: 167-70.
70. Harman KE, Gratian MJ. A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris. Br J Dermatol 2000; 143: 343-8.
71. Yano C. A case of pemphigus vulgaris treated with plasmapheresis. J Dermatol 2000; 27: 380-5.
72. Harman KE. The severity of oral and cutaneous pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. Br J Dermatol 2001; 144: 775-80.

73. Cheng SW. Monitoring disease activity in pemphigus. Br J Dermatol 2002; 147: 262-5.
74. Aoyama Y. An experience for ELISA for desmoglein 1. Eur J Dermatol 2000; 10: 18-21.
75. Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H. Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupfer cells. J Immunol 1997; 159: 97-106.
76. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M. Caspase 1 processes IFN-gamma inducing factor and regulates LPS induced IFN-gamma production. Nature 1997; 386: 619.
77. Tone M, Thompson S, Tone Y, Fairchild PJ. Regulation of IL-18 gene expression. J Immunol 1997; 159: 6156-63.
78. Dao T, Mehal WZ, Crispe IN. IL-18 augments perforin dependant cytotoxicity of liver NK-T cells. J Immunol 1998; 161: 2217-22.
79. Kohka H, Yoshino T, Iwaghi H. Interleukin 18, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 expression in KG-1 cells. J Leukoc Biol 1998; 64: 519-27.
80. Xu D. IL-18 induces the differentiation of TH1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. Eur J Immunol 2000; 30: 3147-56.
81. Lebel Binay S, Berger A. IL-18: biological properties and clinical implications. Eur Cytokine Netw 2000; 11: 15-26.
82. Nakamura H, Komatsu K, Ayaki M. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12 e IL-18 in patients with acute graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: S45-50.
83. Takubo T, Okura H, Kumura T. Human IL-18 bioactivity in hematological malignancies with highly elevated serum IL-18 levels. Acta Haematol 2000; 103: 162-4.
84. Grobmyer SR, Lin E. Elevation of IL-18 in human sepsis. J Clin Immunol 2000; 20: 212-5.

85. Shibata M, Hirota M, Nozawa F. Increased concentrations of plasma Il-18 in patients with hepatic dysfunction after hepatectomy. Cytokine 2000; 12: 1526-30.
86. Gracie JA, Forsey RJ. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. J Clin Invest 1999; 104: 1393-401.
87. Wong CK, Ho CY, Li EK. Elevation of proinflammatory cytokine and Th2 cytokine concentrations in patients with SLE. Lupus 2000; 9: 589-93.
88. Torre D. Circulating levels of IL-18 in adult and pediatric patients with HIV-1 infection. AIDS 2000; 14: 2211-2.
89. Fassbender K, Mielke O, Bertsch T. Interferòn gamma in inflammatory CNS diseases. Neurology 1999; 53: 1104-6.
90. Pizarro TT, Michie MH. IL-18 is up-regulated in Crohn's disease. J Immunol 1999; 162: 6829-35.
91. Ida A, Tsuji Y. IL-18 in pregnancy. J Reprod Immunol 2000; 47: 65-74.
92. Park MC, Park YB, Lee SK. Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 2004;23:225-9.
93. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. Mediators Inflamm 2005;5:273-9.
94. Musabak U, Pay S, Erdem H, Simsek I, Pekel A, Dinc A, Sengul A. Serum interleukin-18 levels in patients with Behcet's disease. Is its expression associated with disease activity or clinical presentations?. Rheumatol Int 2005;:1-6.
95. Zhou Y, Yamaguchi E, Hizawa N, Nishimura M. Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene promoter in sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2005;22:105-13.
96. Inomata S, Shijubo N, Kon S, Maeda M, Yamada G, Sato N, Abe S, Uede T. Circulating interleukin-18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in patients with tuberculosis. Cytokine 2005;30:203-11.

97. Mosaad YM, Metwally SS, Auf FA, AbdEL-Samee ER, el-Deek B, Limon NI, el-Chennawi FA. Proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-18) in immune rheumatic diseases: relation with disease activity and autoantibodies production. Egypt J Immunol 2003;10:19-26.

98. Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2005;11:605-8.

99. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 is associated with viral load and disease progression in HIV-1-infected patients. Microbes Infect 2004; 6: 1273-7.

100. Itoi H, Fujimori Y, Tsutsui H, Matsui K, Sugihara A, Terada N, Hada T, Kakishita E, Okamura H, Hara H, Nakanishi K. Involvement of interleukin-18 in acute graft-versus-host disease in mice. Transplantation 2004; 78: 1245-50.

101. Yoshizawa Y, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K. Serum cytokine levels in atopic dermatitis. Clin Exp Dermatol 2002;27:225-9.

102. Naik SM, Cannon G, Burbach GJ, Singh SR, Swerlick RA. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. J Invest Dermatol 1999; 113: 766-72.

Anexo 1. **Carta de Consentimiento Informado**

Autorización para participar en el proyecto de investigación titulado:

Análisis preliminar de los niveles de Interleucina 18 como marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar.

Investigador:

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

1. El proyecto de investigación corresponde a Riesgo mínimo.

2. Apartados

I. El médico del estudio invita al paciente a participar en un estudio de investigación debido a que padece una enfermedad llamada Pénfigo Vulgar, que es una enfermedad ampollosa de la piel y las mucosas. En este estudio se evaluará un nuevo estudio de laboratorio que servirá para determinar la severidad de la enfermedad que padece (Pénfigo vulgar).

El marcador de laboratorio se llama Interleucina 18 y se usará para evaluar la severidad de la enfermedad que padece. Para llevar a cabo esto se necesitará una muestra de sangre de 5mL que se analizará sin costo alguno y al analizarse se comparará con pacientes que no tengan la enfermedad.

II. Si participa en el estudio, se requerirá solo una visita en la que se tomarán todos los datos necesarios para su participación. La toma de muestra de sangre de 5mL es el único procedimiento que se realizará y que implicará una pequeña molestia transitoria en el sitio de la punción. El objetivo de esta toma de muestra es analizarla y determinar una sustancia en la sangre que se llama Interleucina 18 que se comparará con mediciones hechas en pacientes sin la enfermedad y ver si tiene utilidad para ver la severidad de su enfermedad.

III. Además de la incomodidad de la consulta, los riesgos y molestias que se conocen debido a los procedimientos de este estudio podrán incluir algunos:

La punción venosa superficial para obtener la muestra de sangre de 5mL puede incluir molestias locales como dolor leve a moderado, transitorio, no incapacitante ni con secuelas en el resto del organismo.

Debido a que se tomará la muestra con todas las medidas de asepsia y antisepsia, se reduce casi al total el riesgo de contaminación local, que si ocurriera se constituiría con eritema y edema locales, con dolor leve a moderado, que cede con antibioticoterapia sistémica que sería proporcionada por el investigador en caso de presentarse en el sitio de punción, dentro de las dos semanas posteriores a la toma de la muestra de sangre de 5mL.

IV. Es posible que este nuevo marcador de laboratorio permita detectar fielmente la severidad de la enfermedad con lo que se podría instaurar un tratamiento mas efectivo que disminuya la severidad de las crisis o exacerbaciones de la enfermedad. Sin embargo, es necesario que sepan que este marcador de laboratorio no se puede considerar como efectivo completamente y que puede dar resultados no útiles y que no reflejen la severidad de la enfermedad. El paciente podría no beneficiarse por participar en el estudio, pero su participación podría ayudar a otros pacientes en el futuro, gracias a la información que se obtenga.

V. Gracias a la información que se obtenga que se podría crear un reactivo que permitiría detectar mas fielmente la actividad de la enfermedad que padece, con lo que usted se beneficiaría al reducir sus gastos hospitalarios y su calidad de vida sería mejor ya que podríamos conocer con prontitud si su enfermedad tiene posibilidades de activarse o no.

VI. El médico del estudio está disponible para contestarle cualquier pregunta que pueda tener acerca del marcador de laboratorio descrito o del procedimiento del estudio.

VII. El paciente no renuncia a ningún derecho legal por el hecho de firmar esta carta de consentimiento. La firma del paciente indica ha leído y entendido la información de esta carta. Se le ha explicado el estudio y ha podido hacer preguntas sobre todo lo que no entendía bien, y las preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Además, se comprende que la participación del paciente es totalmente voluntaria. El no desear participar en el estudio no supondrá ninguna multa, nadie se enojará con el paciente o sus familiares y su decisión no influirá en la atención médica a la que el paciente tenga derecho en esta institución de salud.

VIII. El paciente tiene derecho a la confidencialidad y todos los datos recopilados en este estudio permanecerán confidenciales, dentro de los límites que marque la ley.

Es posible que los resultados del estudio, cualquiera que sean, se publiquen en un medio electrónico o escrito, por lo que usted mediante la firma de este documento lo autoriza, siempre y cuando se mantenga secreta u oculta la identidad del paciente.

IX. El paciente y el responsable legal tendrán derecho a conocer los resultados del estudio practicado, asimismo se les explicará detalladamente el significado de dichos resultados.

X y XI. Ni al paciente ni a los familiares se le cobrarán nada por el marcador de laboratorio ni por la evaluación clínica realizada como parte del estudio. El marcador de laboratorio se determinará gratuitamente por parte del investigador como parte del estudio.

La atención de problemas de salud no relacionados con este estudio seguirá siendo responsabilidad del paciente, como lo hace habitualmente.

Ni el paciente ni los familiares recibirán compensación económica por la participación del paciente en el estudio.

En caso de daños directamente relacionados con la investigación que ameriten tratamiento médico, éste será proporcionado en su totalidad por los investigadores hasta su resolución. No se contempla la posibilidad de compensación económica (indemnización) por tener esta investigación recursos limitados.

XII y XIII.

Nombre o huella digital del paciente _____

Fecha _____

Familiar o Responsable legal _____

Fecha _____

Testigo 1(Nombre y Dirección) _____

Fecha _____ Relación con el paciente _____

Testigo 2 (Nombre y Dirección) _____

Fecha _____ Relación con el paciente _____

XIV. Si el paciente o los familiares creen que el paciente tiene algún problema de salud secundario a su participación en este estudio, por favor acuda (n) de inmediato con el Dr. Andrés Tirado Sánchez al Servicio de Dermatología del Hospital General de México de 8 a 16hr con este documento o llame al celular 5527-44-2811 las 24hrs.

XV. En caso de requerir atención médica después del horario mencionado (8 a 16hrs), acuda al Servicio de Urgencias del Hospital General de México, disponible las 24hrs.

Anexo 2. **Hoja de Recolección de Datos.**

Proyecto de Investigación.- **"Análisis preliminar de los niveles de Interleucina 18 como marcador y predictor de daño epidérmico en pacientes con pénfigo vulgar.".**

México, D.F. a _____ de _____ del 200__

Iniciales_____

Número de expediente _____

Edad _____

Sexo _____

PAAS _____ **Fecha.-** _____

PAAS _____ **Fecha.-** _____

PAAS _____ **Fecha.-** _____

PAAS _____ **Fecha.-** _____

Concentración plasmática de IL-18 _____ **Fecha.-** _____

Concentración plasmática de IL-18 _____ **Fecha.-** _____

Concentración plasmática de IL-18 _____ **Fecha.-** _____

Concentración plasmática de IL-18 _____ **Fecha.-** _____

Dosis de esteroide oral.- _____

Variedad fenotípica del pénfigo.- _____

Anexo 3. Procedimiento para la recolección de la muestra.

Objetivo.- Detallar los pasos a seguir para una correcta recolección de muestra sanguínea para la determinación de las concentraciones plasmáticas de Interleucina 18 (IL-18).

Alcances.- Pacientes con carta de consentimiento informado.

Responsable.- Dr. Andrés Tirado Sánchez.

Referencias.- Instrucciones insertas en el estuche comercial Enzyme Immunoassay.

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

Desarrollo.-

1. La persona responsable de la toma de la muestra debe traer una identificación visible.
2. Preguntar al paciente su nombre y apellidos completos
3. Se identificar el tubo con la información del paciente, el número del expediente y la fecha.
4. Preparar todo el material necesario
5. Sentar al paciente, colocar el brazo del paciente en la paleta de la silla para la toma de la muestra.
6. Realizar asepsia al tapón del tubo
7. Colocar la aguja y el tubo al adaptador del Vacutainer
8. Seleccionar una vena periférica adecuada (extremidad superior derecha preferentemente)
9. Limpiar el área a puncionar con una torunda con alcohol, primero en la zona de punción y posteriormente en círculos excéntricos, esperar a que seque y no volver a tocar sin guantes.
10. Aplicar el torniquete (no más de 1 minuto).
11. Ponerse los guantes y avisar al paciente de la punción

12. Puncionar en ángulo de 45º con respecto al eje de la piel, con el bisel de la aguja hacia arriba.
13. Extraer 5mL de sangre
14. Liberar el torniquete cuando la sangre comienza a fluir.
15. Colocar un nuevo algodón sobre el sitio de la punción y ejercer una presión suave por 1 a 3 minutos o hasta que no se vea rastro de sangrado.
16. Descartar la aguja y los guantes en los recipientes correspondientes.
17. Llevar el tubo inmediatamente a centrifugar
18. Pipetear el sobrenadante (plasma) y colocarlo en un criotubo previamente rotulado como en el tubo original de la muestra.
19. Posteriormente mantener en congelación a -20 o -30º C hasta su procesamiento.