

Deficiencia de Desmogleína-4 exacerba el agrandamiento de nódulos linfáticos y disminuye niveles de inmunoglobulinas en respuesta a un desafío inmune

Desmoglein-4 deficiency exacerbates lymph node enlargement and decreases immunoglobulin levels in response to an immunologic challenge

Viruel, Luciana Belén^{1,2}; Pitton, Josefina^{1,2}; Michel, María Cecilia^{1,2}; Moiso, Abril³; Soaje, Marta^{1,3}; Pietrobon, Elisa Olivia^{1,3}; Watanabe, Saki¹; Valdez, Susana Ruth^{1,4}; Sánchez, María Belén^{1,2}; Mackern-Oberti, Juan Pablo^{1,3}

¹ Universidad Juan Agustín Maza. Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales; Argentina

² IMBECU - CONICET; Argentina

³ UNCuyo. Facultad de Ciencias Médicas; Argentina

⁴ UNCuyo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; Argentina

DOI: <https://doi.org/10.59872/icu.v8i11.506>

Correo de correspondencia: jpmackern@mendoza-conicet.gob.ar

Recepción: 17/05/2024; Aceptación: 29/05/2024;

Publicación: 02/07/2024

Palabras claves: Desmogleína 4, Nódulo linfático, Inmunoglobulina, Inflamación; Inmunidad

Keywords: Desmoglein 4, Lymph node, Immunoglobulin, Inflammation, Immunity

Resumen

La deficiencia de Dsg4 se asocia con alteraciones del folículo piloso y pérdida de pelo en humanos, ratones y ratas. Lamentablemente, no se ha abordado el papel de la Dsg4 en la inmunidad humoral o en la modulación del drenaje linfático en respuesta a una inflamación local. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar si la deficiencia de Dsg4 altera el compromiso linfático y perjudica la inducción de anticuerpos. Para ello, ratas deficientes en Dsg4 (Dsg4 nulo) y ratas controles Sprague Dawley (SD) recibieron 3 aplicaciones tópicas de imiquimod por tres días consecutivos por dos semanas para evaluar el agrandamiento de ganglios linfáticos. Además, ambas cepas de ratas fueron inoculadas intradérmicamente con ovoalbúmina (OVA) para evaluar los niveles de IgA e IgM específicos. Se determinó la infiltración leucocitaria y alteración epidérmica por histología. Sorprendentemente, las ratas Dsg4 nulo mostraron niveles más bajos de IgM e IgA específica para OVA. Cuando evaluamos la expansión de los ganglios linfáticos axilares y braquiales observamos que las ratas Dsg4 null mostraban un aumento del peso de los ganglios linfáticos en comparación con las ratas SD. Estos resultados sugieren que la desmogleína-4 puede contribuir a la formación de una respuesta inmune humoral específica. Aunque son necesarias más investigaciones, nuestros resultados sugieren un nuevo papel a la Dsg4 en el apoyo a la inducción de la inmunidad humoral durante una exposición intradérmica al antígeno y la modulación del agrandamiento de ganglios linfáticos drenantes.

Abstract

Dsg4 deficiency is associated with hair follicle alterations and hair loss in humans, mice and rats. Unfortunately, the role of Dsg4 in humoral immunity or in modulating lymphatic drainage in response to local inflammation has not been addressed. The aim of our work was to determine whether Dsg4 deficiency alters lymphatic engagement and impairs antibody induction. To this end, Dsg4 deficient rats (Dsg4 null) and control Sprague Dawley (SD) rats received 3 topical applications of imiquimod for three consecutive days for two weeks to assess lymph node enlargement. In addition, both strains of rats were intradermally inoculated with ovalbumin (OVA) to assess specific IgA and IgM levels. Leukocyte infiltration and epidermal alteration were determined by histology. Surprisingly, Dsg4 null rats showed lower levels of OVA-specific IgM and IgA. When we evaluated axillary and brachial lymph node expansion we observed that Dsg4 null rats showed increased lymph node weight compared to SD rats. These results suggest that desmoglein-4 may contribute to the formation of a specific humoral immune response. Although further investigations are needed, our results suggest a novel role for Dsg4 in supporting the induction of humoral immunity during intradermal antigen exposure and modulation of draining lymph node enlargement.

Introducción

Las Desmogleínas (Dsg) son moléculas transmembrana de tipo cadherina ubicadas en el desmosoma que participan principalmente en los mecanismos de adhesión, pero también están implicadas en otros tipos de procesos celulares como por ejemplo la diferenciación de células epiteliales, activación, proliferación y señalización celular (Brennan *et al.*, 2007). Las Dsgs se expresan principalmente en los epitelios estratificados (Getsios *et al.*, 2004). En la piel, las diferentes isoformas de Dsg se expresan diferencialmente a medida que las células epiteliales basales se diferencian en queratinocitos terminales de la epidermis (Holthofer *et al.*, 2007; Kottke *et al.*, 2006). Las Dsg2 y Dsg3 se expresan principalmente en capas inferiores, mientras que Dsg1 y Dsg4 se expresan en las capas superiores del epitelio (Kottke *et al.*, 2006). La Dsg4 está muy vinculada con la función del folículo piloso donde se encuentra altamente expresada (Bazzi *et al.*, 2006). Se ha informado de que las alteraciones en la expresión de Dsg2 y Dsg3 favorece una desregulación proliferativa y una diferenciación aberrante que perjudica la integridad del tejido (Merritt *et al.*, 2002). La deficiencia de Dsg4 se asocia con una diferenciación anormal del folículo piloso (Kljuic *et al.*, 2003). Sin embargo, la regulación de las células inmunitarias de la piel y queratinocitos por parte de las Dsg4 y su impacto en la inducción de la respuesta inmune adaptativa no se ha abordado previamente.

Recientemente hemos reportado que ratas deficientes en Dsg4 desarrollan una lesión inflamatoria cutánea más grave que ratas controles en respuesta a imiquimod, un ligando de TLR7 que produce una gran respuesta inflamatoria con reclutamiento leucocitario y una marcada producción local de citocinas inflamatorias. Además, mostramos que la deficiencia de Dsg4 conduce a cambios histológicos sorprendentes correspondientes a una respuesta proliferativa aberrante de queratinocitos a IMQ comparables a una lesión psoriasisiforme en mujeres (Moreno-Sosa *et al.*, 2021). Estos datos sugieren que la ausencia de Dsg4 lleva a una respuesta inflamatoria exacerbada indicando que queratinocitos (KC) expresando Dsg4 funcional podrían cumplir funciones moduladoras de la respuesta inmune. A pesar de todo el conocimiento entre las interacciones de los epitelios con células inmunes, el rol de la Dsg4 sobre la producción de anticuerpos y una respuesta inmune adaptativa específica de antígeno es desconocido.

El objetivo de este trabajo es identificar el rol de Dsg4 en la modulación de la respuesta inmune adaptativa específica de antígeno inducida localmente en la piel. Al caracterizar la respuesta inmunitaria adaptativa frente a un desafío inmune cutáneo en ratas deficientes en Dsg4 (OFA hr / hr IFFA CREDO), podremos corroborar que las moléculas de la piel pueden cumplir un rol fundamental en la inducción de la respuesta inmune específica. Con estos antecedentes nos planteamos como hipótesis que la deficiencia de Dsg4 altera la respuesta inflamatoria cutánea impactando en la funcionalidad de los ganglios linfáticos drenantes y perjudicando la respuesta inmune. Comprender la modulación de KC y los factores derivados de estos nos ayudará a comprender la patogénesis de las enfermedades cutáneas mediadas por el sistema inmune donde estén involucrados los linfocitos B y T.

Materiales y métodos

Para el desarrollo experimental utilizamos ratas OFA hembras, que carecen de vello corporal en la edad adulta debido a una delección intragénica del locus Dsg4 en un background genético Sprague Dawley (originalmente comprado a Iffa Credo, Oncins, Francia, denominado IFL Nu en ese momento, posteriormente OFA hr/hr y Dsg4 nulo en este trabajo) y ratas SD criadas en bioterio de nuestro instituto. Se utilizaron ratas de ocho semanas de ambas cepas. Se mantuvieron en condiciones estándar de luz (06.00-20.00 h) y temperatura. El agua y los alimentos (comida para ratas, GEPSA, Córdoba, Argentina) estaban disponibles ad libitum. Todos los animales fueron cuidados de acuerdo con los Principios Rectores en el Cuidado y Uso de Animales del Instituto Nacional de Salud (NIH US). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (aprobación del protocolo nº 88/2016, renovado 2019 y 2022).

La administración de imiquimod (IMQ) se utiliza experimentalmente para emular una dermatitis cutánea similar a la psoriasis (Bodenlenz *et al.*, 2017; Bong *et al.*, 2002). Las ratas fueron tratadas tópicamente con 100 mg de crema Miquimod® conteniendo 5% de IMQ (Miquimod®, Laboratorio Lazar), o con vaselina, una vez al día durante 3 días consecutivos (día 0 a 3) por semana por dos semanas consecutivas en un área de 4 cm² de la piel dorsal de la región lumbar. Antes de la administración de IMQ, se afeitaron las ratas SD para liberar la piel del pelo. Al día 15 se realizó la eutanasia. Los animales de cada cepa se distribuyeron en cuatro grupos, grupo 1: SD sin tratar; grupo 2: SD IMQ; grupo 3: Dsg4 nulo sin tratar, y grupo 4: Dsg4 nulo IMQ. Se obtuvieron diferentes piezas cutáneas para estudios histológicos con hematoxilina/eosina, Tricrómico de Masson y corte semifino con azul de toluidina. Se obtuvieron los ganglios linfáticos axilares y bazo, se pesaron para evaluar indirectamente el compromiso de la respuesta inmune adaptativa local y sistémica a IMQ.

Para la evaluación de la inducción de anticuerpos específicos, los animales fueron inmunizados con Ovoalbúmina (OVA) en forma intradérmica adicionando en forma tópica en el sitio de la inoculación IMQ o vaselina como adyuvante. Luego de 7 días los animales recibieron una dosis adicional de OVA sin adyuvante o vaselina. A los 15 días de la primera inmunización se recolectó sangre por corte de la vena de la cola para la obtención de suero. La presencia de anticuerpos específicos para OVA en suero se determinó por ELISA indirecto sensibilizando la placa por 12 h con OVA 10 µg/ml, bloqueo, muestra suero, anticuerpo secundario anti-rat cadena µ y γ conjugado con peroxidasa (SIGMA, US) utilizando protocolos convencionales. En forma adicional se inoculó con En total habrá 4 grupos de animales Grupo 1: SD OVA (control sin adyuvante), Grupo:2 SD IMQ-OVA, Grupo 3: Dsg4 nuloOVA, y Grupo 4: Dsg4 nuloIMQ OVA (control sin adyuvante).

Resultados

Se demostró una asociación entre la deficiencia de DSG4 y la exacerbación de la dermatitis psoriasisiforme mediante una intensa lesión cutánea con costras y eritema en ratas OFA en respuesta a IMQ en comparación con la cepa control SD tratada con IMQ que presentó un eritema leve (Figura 1). De forma similar, al evaluar las alteraciones histológicas en cortes teñidos con hematoxilina/eosina observamos una gran infiltración leucocitaria dérmica y alteraciones en el epitelio estratificado con hiperqueratosis y paraqueratosis con engrosamiento del epitelio en ratas Dsg4 nulo IMQ en comparación con muestras de ratas SD IMQ.



Figura 1. Lesiones cutáneas exacerbadas debidas a la ausencia de Dsg4 en respuesta a IMQ. Dsg 4 (ratas deficientes en Dsg4); SD (ratas Sprague-Dawley); IMQ (imiquimod). IMQ fue administrado en forma tópica por tres días consecutivos por dos semanas consecutivas.

Al evaluar el epitelio estratificado en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina observamos alteraciones similares a las observadas con hematoxilina eosina junto con alteraciones en la disposición de células basales en las ratas Dsg4 nulo IMQ (Figura 2A y 2B). Por el contrario, la tinción con Tricrómico de Masson en muestras cutáneas no evidenció diferencias del tejido conectivo entre los diferentes tratamientos y cepas de animales (Figura 2C). Estos resultados apoyan la evidencia de que la ausencia de Dsg4 altera la respuesta cutánea a imiquimod.

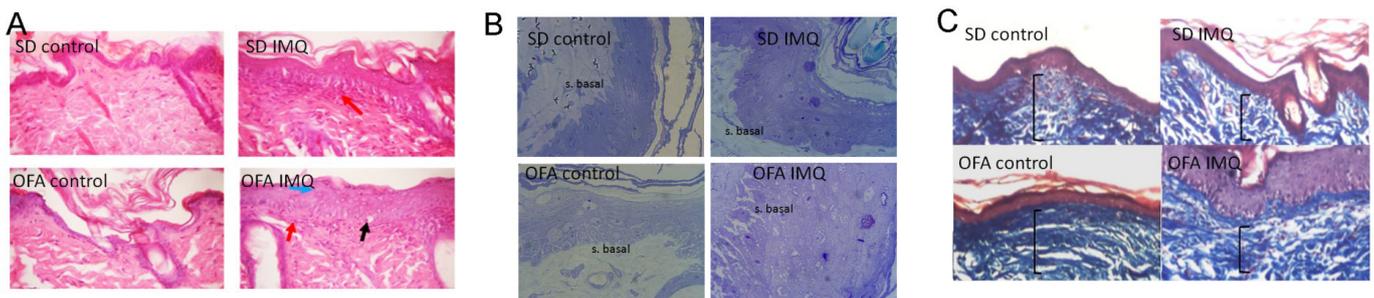


Figura 2. Estudios histológicos de la respuesta cutánea a IMQ en ratas deficientes en Dsg4 y ratas SD controles. A, cortes de piel tratada con IMQ de ratas Dsg4 nulo y SD controles teñidas con hematoxilina eosina. La flecha negra marca la degeneración hidrópica, la flecha azul marca la hiperqueratosis y la flecha roja infiltrado mononuclear. B, cortes semifinos de piel tratados con IMQ o controles sin tratamiento coloreados con azul de toluidina. S. Basal, estrato basal. C, cortes de piel coloreados con tinción Tricrómico de Masson para evidenciar tejido conectivo dérmico. En este caso el tratamiento con IMQ no evidenció diferencias en ratas Dsg4 y SD controles.

Posteriormente, al evaluar el agrandamiento de los ganglios linfáticos drenantes observamos que la ausencia de Desmogleína 4 no presenta alteraciones en condiciones basales sin estimulación regional. Sin embargo, ratas Dsg4 nulo presentan un agrandamiento exacerbado de ganglios linfáticos drenantes en respuesta a IMQ. Como se puede observar en la Figura 3, ganglios linfáticos de ratas OFA presentan un aumento de aproximadamente 2,5 veces en comparación con ratas SD en respuesta a IMQ sugiriendo que la respuesta epidérmica exacerbada se refleja en ganglios linfáticos drenantes que podría impactar en la respuesta inmune adaptativa (Figura 3A y 3B). Por el contrario el peso de los bazo no se vio afectado por tratamiento o por cepa de animal (Figura 3C).

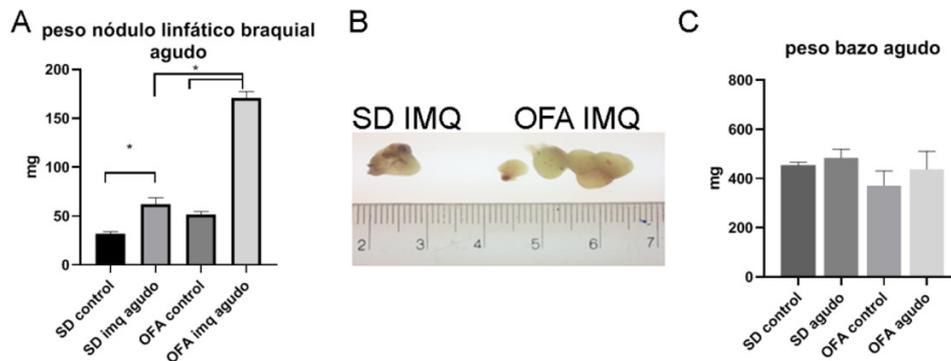


Figura 3. Respuesta de ganglios linfáticos frente a imiquimod en ratas deficientes en Dsg4. A, peso de nódulos linfáticos braquiales en respuesta aguda a IMQ de ratas OFA Dsg4 nulo y ratas SD. B, fotografía de ganglios linfáticos braquiales de SD y OFA tratados con IMQ. C, peso del bazo de ratas OFA Dsg4 nulo y SD controles y tratadas con IMQ tópica como una medida del alcance sistémico de la respuesta a IMQ.

Finalmente, determinamos la inducción de una respuesta inmune humoral adaptativa específica para OVA administrada intradérmica en ambas cepas de animales seguida de la aplicación tópica de IMQ por tres días consecutivos. Sorprendentemente, la inducción de la respuesta inmune humoral específica se encontró perjudicada dado que los niveles de IgM e IgA de ratas Dsg4 nulo y Dsg4 IMQ se encontraron disminuidos en comparación con SD y SD IMQ (Figura 4A y 4B).

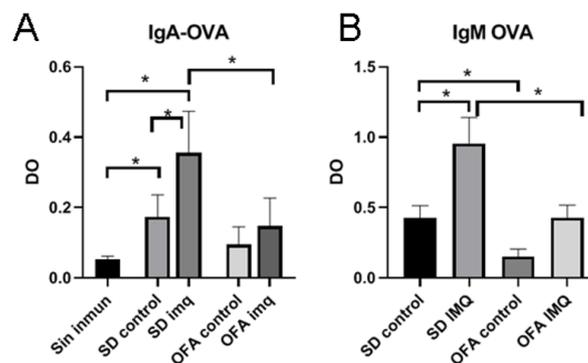


Figura 4. Respuesta inmune humoral específica frente a un desafío intradérmico seguido de administración tópica de IMQ. A, niveles de IgA sérica específica para OVA en ratas sin exposición a OVA y ratas desafiadas con OVA e IMQ. B, niveles de IgM sérica específica para OVA en ratas desafiadas con OVA e IMQ. Todos estos parámetros fueron desarrollados por la técnica de ELISA indirecto.

Discusión

Nuestros resultados sugieren que la Dsg4 ajusta la función de los queratinocitos para mantener controlada la producción de genes inflamatorios con el fin de apoyar la homeostasis de la piel y colaborar con la respuesta inmune regional. Hasta donde se sabe, este es el primer estudio informado sobre cómo la deficiencia de Dsg4 perjudica la inducción de una respuesta inmune humoral.

En nuestro estudio hemos evidenciado que la falta de Dsg4 interfirió con la respuesta de la piel a la estimulación con IMQ mostrando un fenotipo inflamatorio más severo con lesiones cutáneas de tipo psoriasiforme como habíamos reportado previamente (Moreno-Sosa *et al.*, 2021). Al evaluar la reactividad linfática en las ratas deficientes en Dsg4 observamos un agrandamiento de los ganglios linfáticos drenantes de la zona de inoculación de IMQ sugiriendo que las alteraciones cutáneas impactan en las células inmunes presentes en el ganglio linfático. Estos datos están de acuerdo con observaciones en pacientes con Linfadenitis Dermatopática donde se evidencia un agrandamiento de ganglios linfáticos debido a una afección cutánea (Garces *et al.*, 2020). Algunos investigadores han planteado la hipótesis de que los estímulos antigénicos continuos cutáneos, como lo hemos observado en nuestro estudio con IMQ, con la consiguiente producción local de citocinas, conducen a la migración de células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos regionales. Según nuestras búsquedas bibliográficas, este es el primer reporte donde se vincula una deficiencia genética de una Desmogleína con la respuesta linfática.

Adicionalmente, nuestros resultados relacionados con una inducción leve de la respuesta inmune específica frente a OVA por parte de ratas deficientes en Dsg4 está de acuerdo con reportes donde se observa que las células dendríticas captan y endocitan antígenos peptídicos mediante estructuras celulares dependientes de uniones estrechas de tipo «tight junction» (Ouchi *et al.*, 2011).

Conclusiones

Sugerimos que una expresión adecuada de Dsg4 en KCs restringe, ya sea directa o indirectamente, la señalización intracelular después de una estimulación inflamatoria para prevenir una inflamación dañina. Por lo tanto, proponemos que la deficiencia de Dsg4 desencadena un aumento descontrolado de quimiocinas proinflamatorias en respuesta a IMQ. Como proyecciones futuras derivadas del presente proyecto, la utilización de estos resultados en la práctica clínica dermatológica podría ayudar en el seguimiento y clasificación de pacientes con afecciones dermatológicas mediadas por el sistema inmune.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por PIP 0081-2015 y PIP 2023-2025GI de CONICET Argentina, y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 02642-2018, PICT 1052-2015, PICT 01762-2019, PICT 2021-GRFTII 00279, PICTA 2022-03-00106, SIIPJ082/2019 de Universidad Nacional de Cuyo, UMaza Facultad de Ciencias Veterinarias, UMaza UPV, UMaza Secretaría de Ciencia y Técnica, y CIUDA 2021 Universidad del Aconcagua.

Agradecimientos

Agradecemos a Laboratorio INNOVIS, UPV Unidad de Prácticas Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales de la Universidad Juan Agustín Maza. Agradecemos a Vet. Carla Accorinti, Tec. Maritza Valerio, Tec. Juan Rosales, Tec. Hernán Farías y Vet. Paula Ginevro pertenecientes al servicio de bioterio, al Dr. Darío Cuello Carrión y Lic. Silvina Gómez por su contribución comprometida a este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Bazzi, H., Getz, A., Mahoney, M. G., Ishida-Yamamoto, A., Langbein, L., Wahl, J. K., 3rd, & Christiano, A. M. (2006). Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. *Differentiation*, 74(2-3), 129-140. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00061.x>
- Bodenlenz, M., Prietl, B., Florian, P., Subramaniam, A., Kainz, S., Rauter, G., . . . Sinner, F. (2017). 502 Characterization of the Psoriasis-like Inflammation in the Imiquimod Rat Model using Dermal Open Flow Microperfusion. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(10, Supplement 2), S278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.698>
- Bong, A. B., Bonnekoh, B., Franke, I., Schon, M., Ulrich, J., & Gollnick, H. (2002). Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. *Dermatology*, 205(2), 135-138. <https://doi.org/10.1159/000063904>
- Brennan, D., Hu, Y., Joubert, S., Choi, Y. W., Whitaker-Menezes, D., O'Brien, T., . . . Mahoney, M. G. (2007). Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci*, 120(Pt 5), 758-771. <https://doi.org/10.1242/jcs.03392>
- Garces, S., Yin, C. C., Miranda, R. N., Patel, K. P., Li, S., Xu, J., . . . Medeiros, L. J. (2020). Clinical, histopathologic, and immunoarchitectural features of dermatopathic lymphadenopathy: an update. *Mod Pathol*, 33(6), 1104-1121. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0440-4>
- Getsios, S., Huen, A. C., & Green, K. J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 271-281. <https://doi.org/10.1038/nrm1356>
- Holthofer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., & Leube, R. E. (2007). Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol*, 264, 65-163. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(07\)64003-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(07)64003-0)
- Kljuic, A., Bazzi, H., Sundberg, J. P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M. G., . . . Christiano, A. M. (2003). Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell*, 113(2), 249-260.
- Kottke, M. D., Delva, E., & Kowalczyk, A. P. (2006). The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci*, 119(Pt 5), 797-806. <https://doi.org/10.1242/jcs.02888>
- Merritt, A. J., Berika, M. Y., Zhai, W., Kirk, S. E., Ji, B., Hardman, M. J., & Garrod, D. R. (2002). Suprabasal desmoglein 3 expression in the epidermis of transgenic mice results in hyperproliferation and abnormal differentiation. *Mol Cell Biol*, 22(16), 5846-5858.
- Moreno-Sosa, T., Sanchez, M. B., Pietrobon, E. O., Fernandez-Munoz, J. M., Zoppino, F. C. M., Neira, F. J., . . . Mackern-Oberti, J. P. (2021). Desmoglein-4 Deficiency Exacerbates Psoriasiform Dermatitis in Rats While Psoriasis Patients Displayed a Decreased Gene Expression of DSG4. *Front Immunol*, 12, 625617. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625617>
- Ouchi, T., Kubo, A., Yokouchi, M., Adachi, T., Kobayashi, T., Kitashima, D. Y., . . . Nagao, K. (2011). Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med*, 208(13), 2607-2613. <https://doi.org/10.1084/jem.20111718>