

## TEMA I: EL QUERATINOCITO

La piel en su conjunto se ha considerado como uno de los órganos más extensos del organismo humano. Constituye del 12 al 15% del peso corporal y en un individuo medio de 70 Kg. y 1'70 m. de estatura puede tener una superficie de 1'85 m<sup>2</sup>.

Clásicamente se ha dividido en tres capas bien definidas desde el exterior al interior del organismo: epidermis, dermis e hipodermis. La primera considerada como una estructura sin vida, si entendemos como tal que no posee circulación sanguínea y linfática, ni sistema nervioso, y las dos restantes como estructuras vivas.

La epidermis es la capa biológica que separa nuestro cuerpo del medio exterior. Por una renovación constante es capaz de reparar la pérdida de la masa celular causada por el rozamiento y mantener un grosor uniforme debido a la duplicación celular que se origina en su capa más profunda.

La epidermis tiene cuatro tipos de células características, los queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel y las células dendríticas cutáneas entre las que se encuentra la célula de Langerhans. Las primeras estructurales, las segundas con actividad en la protección frente a las radiaciones solares y alternativamente nos manifiestan parte del color cutáneo, las células de Merkel con funciones sensitivas y las células de Langerhans de carácter inmunológico.

El queratinocito es una célula de origen ectodérmico cuya misión es la producción de la proteína más abundante en la epidermis, la queratina. En el grosor de la epidermis encontramos distintas modificaciones estructurales en los queratinocitos. Dividimos la epidermis en varios estratos que son conocidos y nombrados por la impresión visual que nos proporciona la imagen al microscopio óptico (MO). De esta forma encontramos histológicamente cuatro capas:

**La capa basal (CB)** unicelular y festoneada, que se sitúa en dirección paralela a la superficie cutánea y con células poligonales redondeadas unidas a la membrana que constituye la unión dermoepidérmica por unos canaliculos denominados *hemidesmosomas*.

La magnitud de su festoneado nos indica una mayor actividad celular y consecuentemente al contrario, el aplanamiento del festoneado mostraría una paralización en las mitosis de las células basales. Clásicamente las hendiduras del festoneado se denominan papilas dérmicas.

**La capa espinosa, escamosa o de Malpighi (CE)**, justamente encima de la basal, constituida por 5-10 hileras de células poligonales en mosaico que se aplanan a medida que se aproximan a la superficie. Como las células basales, están interconectadas por una serie de puentes intercelulares denominados *desmosomas* que al teñirse para su visión al MO nos dan la apariencia de espinas.

**La capa granulosa (CG)**, formada por 2-3 hileras de células aplanadas sobre la capa espinosa caracterizadas por unos gránulos intracelulares de *queratohialina* que nos identifica la estructura en su visión al MO.

Y por último, la **capa o estrato córneo (EC)**, en la que ya no puede hablarse de células, sino de estructuras anucleadas que contienen queratina denominados *corneocitos*, una proteína fibrosa que le da resistencia a la epidermis, lípidos y diversas sustancias del metabolismo celular. (figura 1)

La epidermis es un ejemplo clásico de tejido que se renueva constantemente para mantener su grosor y en la que están presentes células madres (stem cells), en este caso basales. Ellas nos proporcionarán un sistema de cuatro transformaciones celulares que se irán parcial o totalmente diferenciando para constituir las distintas capas anteriormente nombradas.

Las células basales están adheridas a la unión dermo-epidérmica a través de *hemidesmosomas* de características estructurales similares a los desmosomas. Al igual que éstos, tendrán adosados en su parte intracelular una serie de microfilamentos denominados **Tonofilamentos** que serán imprescindibles en el proceso de queratinización.

Dependiendo de la presencia de hemidesmosomas clasificamos las células basales en dos tipos: los queratinocitos serrados, que se sitúan en la parte superior de las hendiduras del festoneado (papilas dermoepidérmicas), fijos al servirse de los hemidesmosomas para no ascender hacia estructuras superiores, y los queratinocitos aserrados, situados en las bases de las crestas papilares, con actividad proliferativa suficiente para diferenciarse, ascender y formar el resto de las estructuras superiores.

#### UNION DERMOEPIDERMICA UDE

El estudio a MO de la UDE nos muestra entre las células basales y la dermis la sola presencia de una fina capa homogénea que se tiñe con el ácido periódico de Schiff (PAS +), sin embargo, la introducción del microscopio electrónico (ME) nos advierte de una estructura más compleja de cuatro láminas.

Anatómicamente la UDE se divide en cuatro zonas:

- Membrana plasmática de las capas basales y sus hemidesmosomas
- Lámina lúcida
- Lámina densa o basal
- Región subbasal

Las estructuras de fijación de estos queratinocitos basales son los hemidesmosomas. Estos atraviesan la placa electrodensa de hemidesmosoma justo encima de la membrana citoplasmática y la estructura trilaminar de 7 a 9 nm de grosor de la membrana citoplasmática del queratinocito basal antigénica para el pénfigo ampolloso.(figura 2)

La segunda capa, inmediatamente inferior, es denominada lámina lúcida que es la estructura hasta donde son capaces de contactar los hemidesmosomas. Tiene un grosor de 20 a 40 nm y está constituida principalmente por laminina. Por encima y por debajo de la placa densa o basal, en lámina lúcida, encontramos los filamentos de anclaje.

Los hemidesmosomas fijan, junto con los filamentos de anclaje, el queratinocito basal a una zona de la placa densa de la lámina lúcida.

A continuación se nos presenta la lámina densa o basal, de entre 30 y 50 nm de grosor, formada por colágenos tipo IV, V y 7S.

Por último, se sitúa la lámina subbasal. Compuesta por tres tipos de estructuras fibrosas:

- las fibrillas o microfibrillas de anclaje, que unen la lámina densa con las fibras de colágeno
- las microfibrillas de naturaleza presumiblemente elástica, que atraviesan la UDE en sentido vertical
- las fibras de colágeno aisladas o agrupadas no ordenadamente, que se unen directamente con la lámina densa o basal.

### COMPONENTES DE LA UDE

Los componentes de la UDE se pueden dividir según sean exógenos o fabricados por la propia estructura. De esta forma nos encontramos con fibronectina y colágeno V que no están sintetizados por la UDE, así como elementos endógenos como laminina, colágeno IV, proteoglicanos y probablemente entactina.

Encontramos en la UDE tres tipos de *colágenos tipo IV, V y 7S*. El colágeno IV es propio de la lámina densa y está formado por una triple hélice polipeptídica parecida al resto de colágenos, con un contenido mayor en hidroxiprolina e hidroxilisina que el colágeno dérmico, así como por una porción terminal no helicoidal más extensa; el colágeno V normal en la piel y de localización no definida y el colágeno 7S de composición similar a otros colágenos pero inmunológicamente distinto. (véase Tema VII)

La *laminina* es una glucoproteína no colagénica de alto peso molecular primordial para la membrana basal que aparece unida a otros componentes de la misma. Se localiza en la lámina lúcida y se encuentra presente en la periferia de las glándulas.

Está formada por tres cadenas enlazadas por puentes disulfuros, dos de 200 KD y una de 400 KD. Su disposición es en forma de cruz latina, con una cadena larga y tres cadenas cortas que se enrollan alrededor de la cadena larga en el centro de la molécula y formar así unos segmentos lineales y otros globulosos.

No contiene hidroxiprolina y su composición en aminoácidos es diferente al colágeno y a la fibronectina. Es capaz de enlazarse al colágeno tipo IV a través de las cadenas cortas, a las superficies celulares por el punto de unión de las cadenas y a la heparina por la fracción globulosa distal de la cadena larga. De esta forma puede considerarse como una molécula importante en la adhesión celular.

Es sintetizada por células epiteliales y endoteliales pero los fibroblastos no la sintetizan. De esta manera presentan un papel fundamental en la formación de los epitelios.

La *entactina* es una proteína sulfatada de 158 KD química y embriológicamente distinta a la laminina y la fibronectina. Se detecta en la UDE por anticuerpos específicos, situándose en las membranas basales de la epidermis normal.

Encontramos *proteoglicanos* de 750 KD en la UDE, concretamente el heparán sulfato, unido a proteínas mediante enlaces covalentes. (véase Tema X) Se localizan preferentemente en la unión entre la lámina lúcida y lámina densa y por su carácter aniónico, repelen la entrada de macromoléculas aniónicas impidiendo su paso y facilitando su eliminación por exocitosis o fijación a la membrana plasmática. Facilitan de igual forma la captación por pinocitosis de materiales segregados por la misma célula.

La *fibronectina* es una glucoproteína de alto peso molecular sintetizada en los queratinocitos y fibroblastos entre otras células, que se sitúa en la lámina lúcida y constituye probablemente una de las moléculas más importantes en la conexión de las distintas estructuras de la UDE.

De la misma forma, la UDE expresa distintos antígenos por anticuerpos específicos como el *antígeno de penfingoide ampollar* que se sitúa a nivel de la lámina lúcida y está elaborado por las células basales formando una capa continua bajo las células basales aún en ausencia de la lámina densa; el *Amiloide P* que es una glucoproteína constitutiva algunas veces de la UDE que deriva del amiloide P sérico; el *antígeno KF1* de localización similar al colágeno IV en la lámina densa; *antígenos de las fibrillas de anclaje* propio de esta fibrillas y el *antígeno de la epidermolisis ampollar adquirida* de localización en la lámina subbasal.

## FUNCIONES DE LA UDE

La UDE posee una serie de funciones vitales para el mantenimiento de la integridad cutánea.

La UDE está encargada de mantener la fijación de la epidermis a la dermis. Para esta fijación de las células basales emplea diversas moléculas que primordialmente son: colágeno, fibronectina, antígeno de penfingoide ampollado y laminina.

La importancia del antígeno del penfingoide ampollado se determinó porque la incorporación a la UDE de sus anticuerpos específicos impedía la unión de la UDE a las células basales. De otra parte hay que destacar, como posteriormente estudiaremos, que no todas las células basales están fijadas a la UDE. En la cinética de la epidermis por lo tanto, hay que distinguir dos fenómenos diferenciados por encontrarnos con dos tipos de células en la capa basal. De un parte, células basales con un comportamiento proliferativo y, de otra, células basales con una actividad divergente. Esto es, parte de las células basales se van a duplicar por mitosis y posteriormente van a diferenciarse para formar las células de las capas superiores, espinosa, granulosa y córnea, y contrariamente, en la zona superior de las crestas dermoepidérmicas se situarán células basales que no se comportan con éste mismo carácter mitótico empleándose en funciones de fijación estructural. Evidentemente, nos volvemos a referir respectivamente a los queratinocitos aserrados (QA) y serrados (QS).

La segunda misión de la UDE es la regulación de la permeabilidad dermo-epidérmica y es llevada a cabo por los proteoglicanos, principalmente el heparán sulfato.

Por último, la morfogénesis dermo-epidérmica es regulada por la UDE a través del colágeno IV y laminina. Este razonamiento se apoya en la presencia de estas dos moléculas en las primeras fases del desarrollo y en la determinación de la función vital de dichas moléculas en los trasplantes de piel humana y en los cultivos celulares epidérmicos sobre una matriz de colágeno o fibroblastos.

## PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LA EPIDERMIS

El comportamiento cinético de las células basales se explica ya que en las profundidades de las crestas papilares se colocan entre 10 y 12 QA que forman la llamada *unidad proliferativa epidérmica (UPE)* y en las zonas altas de las crestas se encuentran los QS que tendrían misiones de anclaje de la epidermis a dermis.(figura 3)

La agrupación celular de la UPE no es lineal sino numular. Seis o siete células se sitúan en forma circular y en su interior se establecen las restantes a las que se les presupone una mayor actividad proliferativa. Esto diferencia la división entre los propios QA en tres categorías: Las células madres (*stem*) de la UPE, las células transitorias en proceso de proliferación migratorio hacia la superficie de la cresta papilar y las células postmitóticas ya formadas en la superficie de la cresta papilar.

Este fenómeno puede explicar tanto la reestructuración cutánea tras traumatismos, como la diferenciación del grosor epidérmico en las distintas zonas cutáneas así como los dermatoglifos individuales.

Las células madres (*stem cell*) se duplican por mitosis y empujan a la nueva célula formada hacia regiones superiores de la epidermis, pasando por el proceso de proliferación hasta generar las células postmitóticas. A medida que las células basales se van diferenciando, se generan las distintas capas epidérmicas. En las células basales son fácilmente observables las mitocondrias, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático, vesículas de pinocitosis, los centríolos, tonofilamentos, tonofibrillas, etc., lo que denota una gran actividad citoplasmática.

Cuando las células basales forman las células postmitóticas llegan a no observarse los centríolos y por tanto a eliminar su capacidad proliferativa. Se inicia entonces un proceso de aplanamiento con orientación de las tonofibrillas hacia la dirección del mismo y aparecen unos gránulos de revestimiento de la membrana que posteriormente generarán los queratinosomas o corpúsculos de Odland influyentes en el proceso de la queratinización. En definitiva, se ha diferenciado la capa espinosa epidérmica. (véase tema II)

Con la formación de gránulos de queratohialina, precursor de la queratina, en los entramados de tonofibrillas comienza la formación de la capa granulosa. Estos gránulos de queratohialina contienen agregados de ribonucleoproteínas electrodensas que se localizan principalmente a lo largo de los tonofilamentos, que son los que proveerán del cemento o matriz para el anclaje final de los mismos. Irán agrupándose y uniéndose mediante la queratohialina formando finalmente la queratina madura en el estrato córneo. Los gránulos de revestimiento migrarán hacia el espacio extracelular, disminuirán las inclusiones celulares, y comenzará la formación de los distintos tipos de queratina.

A su vez y conjuntamente a la síntesis de queratina en la capa granulosa, se alteran los desmosomas y el espacio citoplasmático se reduce en contraposición a la membrana celular que

aumenta enormemente su grosor, siendo el proceso definitivo la queratinización celular completa y la formación del estrato córneo, ya no por células, sino por estructuras queratínicas sin presencia de desmosomas y por lo tanto, de fácil desprendimiento. Estas estructuras queratínicas dejan entonces de denominarse queratinocitos para adoptar la de *corneocitos*.

Intentar cuantificar los intervalos temporales en los que se produce este proceso en la naturaleza es complicado pues depende, aunque se intente calibrar en pieles normales, de la técnica empleada y de la variabilidad individual. Como tiempos de duración de las fases en la tabla HI se muestra una media de los datos obtenidos por algunos autores consultados. Es generalmente aceptado que el tiempo que tarda una célula basal desde su duplicación hasta su desprendimiento en estrato córneo oscila entre 26 y 42 días.

## DESMOSOMAS

La compactación de las células queratínicas epidérmicas viene determinada por las uniones intercelulares que ocasionan los complejos de desmosomas-tonofilamentos. De forma similar a como ocurre con los hemidesmosomas de la UDE, los desmosomas son unos canalículos intercelulares que tienen que atravesar la placa electrodensa citoplasmática de desmosoma, la membrana trilaminar del queratinocito y el espacio intercelular para poder conectar con el queratinocito adyacente. De la placa electrodensa del desmosoma del citoplasma celular queratinocínico parten hacia un lado los desmosomas y hacia el otro, hasta cerca del núcleo en el contenido citoplasmático, los tonofilamentos.

Los desmosomas están constituidos por unos filamentos intermedios (IF) que son estructuras complicadas por el número de cadenas proteicas, por su distribución en los tejidos y células, y por sus funciones. Sus alargadas proteínas están formadas por polipéptidos en  $\alpha$ -hélice que pueden formar estructuras plegadas sobre enrollamientos completamente diferentes a las actinas y tubulinas que pueden acomplejarse por interacciones hidrofóbicas. (véase queratinas)

Los tonofilamentos y microfibrillas de las células epidérmicas también están constituidas por proteínas de los IF, proteínas fibrosas filamentosas pobres en azufre, que finalmente se diferenciarán en queratinas.

A través de los desmosomas se produce un intercambio de los contenidos citoplasmáticos de las células interconectadas y de los contenidos dérmicos que se introducen en las células basales a través de los hemidesmosomas.

El número de desmosomas en el estado embrionario está aumentado respecto al adulto. En cualquier caso, desde la capa granulosa hasta la capa córnea existe una progresiva alteración de estos desmosomas que pierden su capacidad de conexión intercelular. De esta forma, los desmosomas son totalmente degradados antes de producirse la descamación.

La formación de desmosomas y hemidesmosomas depende, al menos en cultivos celulares de la presencia de calcio en el medio. La ausencia de este elemento condiciona que no se produzca adhesión celular. Así, la presencia de calmodulina parece tener una importante misión en la activación del calcio para la formación de desmosomas y hemidesmosomas.

Han conseguido aislarse numerosas moléculas en las estructuras intercelulares queratinocíticas que se destacan en la tabla II. Se conocen al menos dos proteínas calcio-dependientes en los desmosomas: la *desmogleina I* y *II*. La *desmogleina I* es considerada una molécula de adhesión perteneciente al grupo de las cadherinas al igual que otras moléculas también implicadas en función adhesiva de los desmosomas. (véase moléculas de adhesión en tema XVI)

Todas estas moléculas tienen misiones de anclaje entre los queratinocitos de las distintas capas y constituyen por lo tanto un factor importante en la migración y diferenciación queratínica.

## ENVOLTURAS DE LOS QUERATINOCITOS Y TRANSGLUTAMINASAS

En las envolturas queratinocíticas celulares, tanto en las células inmaduras como en las maduras, existen unas estructuras especializadas influyentes en funciones específicas como la movilidad celular, la adaptación espacial para la diferenciación celular, la protección del contenido intracelular, la diferenciación epidérmica y la regulación de la comunicación intercelular y absorción percutánea.

Cuando la maduración de los queratinocitos avanza y los desmosomas se vuelven más débiles, los corneocitos se ven incapaces de mantener la estructura compacta en el estrato córneo. En substitución a los desmosomas aparecen unos enlaces cruzados entre corneocitos adyacentes que son establecidos por la acción de *transglutaminasas* epidérmicas. Estas enzimas son capaces de realizar una unión covalente cruzada entre un residuo glutamina de un corneocito y otro de lisina del adyacente, formando un enlace estable que se denomina  $\epsilon$ - $\gamma$ -(glutamil)lisina. Si bien estos enlaces no poseen la capacidad ligante de los desmosomas si son lo suficientemente activos como para mantener la integridad del estrato córneo. Como sustratos de la enzima se encuentran proteínas solubles de un gran número de precursores insolubles de la envoltura corneal.

Las transglutaminasas son unas enzimas calcio-dependientes que tienen la capacidad de aceptar restos amídicos de la glutamina y catalizar transferencias acilo de la lisina. Esto es, son capaces de sustituir el grupo amino de la glutamina por el grupo amino de lisina o de una poliamina, consiguiendo una nueva amida polimerizada. De esta forma la glutamina incluida en una proteína corneal, se enlaza con una lisina de otra proteína corneal y forman un enlace covalente que une de forma estable a dos corneocitos.

La envoltura corneal constituye un complejo entramado de proteínas escasamente reactivas, netamente insolubles, en las que sorprende la escasa presencia de cistina, esencial en los puentes disulfuros intercatenarios de queratinas, y una alta proporción de ácido glutámico y lisina, que son los sustratos naturales de las transglutaminasas epidérmicas para la formación de los enlaces cruzados  $\epsilon$ - $\gamma$ -(glutamil)lisina entre células corneales.(figura 4)

Cultivos celulares de células epidérmicas demuestran la presencia del 17% de las lisinas de la envoltura situadas en los enlaces  $\epsilon$ - $\gamma$ -(glutamil)lisina, y esta proporción asciende hasta el 18% en las células corneales.

La urea y compuestos tioles como el mercaptoetanol son capaces de alterar esta estructura y producir por lo tanto el desprendimiento corneal ejerciendo su conocida función queratolítica.

El sustrato natural para la formación de estos enlaces cruzados entre corneocitos lo constituyen las moléculas proteicas de la envoltura corneal. En este sentido se consideran como precursores de estos enlaces la involucrina y keratolinina que están a su vez envueltas externamente por una proteína muy inerte denominada loricrina en el estrato córneo. En la envoltura corneal se han identificado además otros restos proteicos que no parecen tener influencia en la formación de los enlaces intercorneales y que no son sustratos de la transglutaminasa.

### **INVOLUCRINA**

La involucrina es la principal proteína citoplasmática precursora de la pared de los queratinocitos y tiene un peso molecular entre 92 KD y 68 KD según se utilicen técnicas físicas o químicas para su determinación. Se sintetiza a nivel del estrato espinoso y se asocia con materiales citoplasmáticos amorfos, especialmente con gránulos de queratohialina que progresivamente se van concentrando en la superficie celular a medida que avanza la maduración. En este tránsito se produce el ataque de las transglutaminasas y la formación de los enlaces cruzados intercelulares.

La involucrina representa aproximadamente el 2% de las proteínas de los queratinocitos maduros de donde se extraen por calentamiento a 95°C, que hace precipitar la mayoría de las proteínas excepto la involucrina que permanece soluble.

Está constituida por 585 aminoácidos de los cuales el 46% son glutaminas / ácido glutámico y el 17'5% son lisinas. Están ordenados desigualmente aunque encontramos una alta proporción de glutamina (20'4%) y ácido glutámico (13'8%) en las regiones C-terminales y N-terminales.

### **KERATOLININA**

Esta proteína fue designada como "la proteína de la membrana epidérmica" (KMP) aunque actualmente se la denomina como keratolinina. Posee un peso molecular de 36 KD y tiene propiedades similares a la keratolinina bovina, aunque lógicamente tenga distintas propiedades inmunológicas.

Es una proteína amorfa de aspecto granular con una cantidad importante de citrulina. Se han encontrado puentes proteicos de keratolinina a través de ornitina en el estrato córneo, insolubles a urea y agentes reductores como los tioles. El proceso de formación de estos puentes es desconocido si bien nos inclinamos a pensar en su derivación de los puentes proteicos de citrulina.

El origen no está absolutamente dilucidado, si bien parece claro que la keratolinina se sintetiza primero como pequeñas subunidades que se combinan para formar una proteína de 36 KD en las capas superiores espinosas durante la diferenciación celular. Posteriormente se incorporan en forma de largos polímeros de 150 KD a la pared celular en donde por la acción de las transglutaminasas formarán los puentes proteicos intercelulares.



## FILAGRINA

Se ha sugerido que la presencia de filagrina en la envuelta corneal constituye una fuente importante para la formación de los enlaces cruzados, aproximadamente el 10% en ratas. Este hecho se apoya además en la circunstancia de que la filagrina contiene aproximadamente un 20% de restos de glutamina / ácido glutámico si bien, como anteriormente referíamos, no está comprobado.

Al igual que la filagrina intracelular que posteriormente estudiaremos como proteína estructural, existen una serie de proteínas que han sido aisladas en la proximidad de la envoltura corneal que pueden ser potenciales donantes de aminas para la transglutaminasa y formar cadenas intercelulares. Entre ellas encontramos a la denominada proteína asociada a la membrana de 195 KD, la proteína de la periferia celular rica en azufre y la putrescina y espermidina en las que ha sido demostrada la formación de enlaces intercatenarios en ratas, así como componentes amorfos de la queratohialina.

## LORICRINA

La capa más externa de la envoltura corneal está constituida por loricrina que es una proteína muy rica en cisteína (7'1%), en glicina (55%) y serina (19%). Tiene un peso molecular ligeramente inferior a los 38 KD y no forma enlaces cruzados. La loricrina es una proteína altamente insoluble que actuaría como esencial para el aislamiento del corneocito frente al medio externo y para mantener la integridad del mismo.

## PROTEINAS ESTRUCTURALES INTRAEPIDERMICAS

El citoesqueleto de las células eucariotas consiste principalmente en tres tipos de estructuras proteicas: microfilamentos de diámetro entre de 5-7 nm. conteniendo *actina* (MF), microtúbulos de 23-25 nm. de diámetro que contienen *tubulinas* (MT) y filamentos intermedios (IF) con un diámetro entre 8 y 15 nm.

Sin lugar a dudas los IF son las estructuras más complicadas por el número de cadenas proteicas, por su distribución en los tejidos y células, y por sus funciones. Sus alargadas proteínas están formadas por estructuras  $\alpha$ -hélice que pueden formar estructuras plegadas sobre enrollamientos completamente diferentes a las actinas y tubulinas que se logran acomplejar por interacciones hidrofóbicas.

Los tonofilamentos y microfibrillas de las células epidérmicas están constituidas por proteínas de los IF que finalmente se denominaron queratinas.

Las queratinas son unas proteínas insolubles formadas por unas cadenas de aminoácidos (aa) unidas entre sí por enlaces de hidrógeno y reforzados por puentes disulfuros. Se conocen hasta 20 proteínas fibrosas epidérmicas formadas por polipéptidos de las distintas queratinas  $\alpha$ -helicoidales filamentosas. Suponen entre el 30-85% del total de las proteínas epidérmicas. La menor concentración de queratina se encuentra en la capa basal con un 30% del peso celular y las células con mayor contenido en queratina son la córnea con un 80% de su peso.

Las queratinas de menor peso molecular (PM) se encuentran en todas las capas y las de mayor PM las encontramos a partir de los procesos de diferenciación.

En la diferenciación córnea desaparecen las queratinas pequeñas y tiene lugar un reagrupamiento por el que encontramos queratinas de alto PM pero sin llegar al conseguido en las diferenciaciones intermedias. Aunque existe una gran variedad, es cierto que están muy relacionadas, aspecto demostrado por la presencia de antígenos comunes.

Estas reacciones antigénicas comunes son debidas a reacciones proteolíticas, glucoxilación, fosforilación y la referida acetilación para formar los enlaces cruzados intercelulares por puentes  $\epsilon$ - $\gamma$ -(glutamil)lisina.

Son particularmente ricas en ácido glutámico / glutamina y en menor cantidad en glicina, serina y leucina. Los característicos enlaces disulfuros cistínicos intercatenarios les aporta la dureza y estabilidad. Cuanto mayor es el contenido en azufre (cistina) más estables y duras son los distintos tipos de queratinas. La queratina es la que confiere a la epidermis la propiedad de resistencia frente a agresiones químicas de ácidos y álcalis y frente a agresiones mecánicas como el rozamiento. El elemento químico *princeps* en los tejidos queratinizados es el azufre. Su concentración en la queratina epidérmica es entre 0'3-1%, y a nivel de queratina de pelo y uña aumenta hasta el 5% y le confiere su mayor dureza.

Los filamentos de queratina contienen dos regiones helicoidales de unos 300 aa aproximadamente uno amino terminal y otro carboxiterminal separados por una región lineal de entre 4-15 aa.

Existen seis tipos de queratinas determinantes del citoesqueleto de las células epiteliales que han podido ser identificadas por anticuerpos monoclonales:

- 1) Queratinas tipo I: *queratinas ácidas* constituidas por 15 cadenas
- 2) Queratina tipo II: *queratinas neutras-básicas* constituidas por 15 cadenas
- 3) Queratinas tipo III uncatenarias entre las que conocemos *vimentina* propia de las células stem embrionarias, *desmina* característica del músculo, *periferina* en las neuronas periféricas y centrales, y *proteína ácida fibrilar glial (GFAP)*
- 4) Queratinas tipo IV uncatenarias consistentes en un triplete de neurofilamentos denominados *NF-L*, *NF-M* y *NF-H*, así como una cuarta proteína neuronal denominada  *$\alpha$ -internexina*
- 5) Queratina tipo V tricaténaria denominada *laminina* constituye el esqueleto (carioesqueleto) del núcleo en la células eucariotas.
- 6) Queratina tipo VI uncaténaria propia de las células stem neuroepiteliales denominada *nestina*

Las cuatro primeras son determinantes en la función citoplasmática en lo que se refiere a su organización espacial y al centrado nuclear.

Las queratinas tipo I y II, presentes primordialmente en los queratinocitos, se subdividen en queratinas numeradas del 9 al 19 (K9, K10, K11, ...) y del 1 al 8 (K1, K2, K3,...) respectivamente según los patrones de coexpresión que presenten.

Los queratinocitos van sufriendo un proceso de queratinización, que varía en función del grado de maduración, a medida que ascienden hacia las capas más superficiales de la epidermis. Las células basales contienen mayoritariamente dos tipos de queratinas: K5 (58 KD) y K14 (50 KD), mientras que los queratinocitos suprabasales modifican su composición sintetizando queratinas K1 (67 KD), K2 (64 KD), K10 (56'5 KD) y K11 (56 KD). En el transcurso del proceso maduración, se produce un aumento progresivo de queratina, con variaciones en sus características químicas.

En general las queratinas no necesitan la presencia de proteínas auxiliares para su formación. Sin embargo, está demostrado que algunos polipéptidos pueden ser indispensables para su síntesis *in vitro*. Es el caso de la *profilagrina* que se encuentra también en los gránulos de queratohialina y es el precursor de la *filagrina*, proteína rica en histidina intermediaria en la agrupación de los filamentos de las queratinas en el último estadio de diferenciación corneal.

Algunas alteraciones y variaciones cutáneas pueden explicarse, o al menos conjeturarse, como defectos o alteraciones en la queratinización epidérmica. Puede explicarse por ejemplo que un aumento en la proliferación de las células basales con una prolongación en la vida media de los desmosomas, permaneciendo constante el proceso de la queratinización, nos llevaría a la presencia de una epidermis más gruesa y queratinizada. Es el proceso que podría tener genéticamente la raza asiática o *raza amarilla* donde la mayor presencia de queratina corneal les hace tener un aspecto más amarillento propio de las queratinas. La queratina posee un color característico que se puede visualizar fácilmente en el cabello con la decoloración de las melaninas y que es amarillo pajizo.

Por el contrario, una ralentización en las mitosis basales nos condicionaría la presencia de una epidermis más fina y transparente. Consecuentemente, la microcirculación sanguínea sería detectada más fácilmente y nos denotaría una piel de aspecto más rojizo. Este fenómeno es posiblemente por el que a los indios norteamericanos les denominemos *pieles rojas*.

Como defectos en la queratinización se están explicando algunas afecciones y patologías actualmente. La etiología de la caspa se plantea hoy en día por un único proceso causado por una elevada proliferación de las células basales sin una alteración en los desmosomas. Ello hace pensar que el tiempo medio que tarda un queratinocito desde la capa basal hasta que se encuentra en el estrato córneo es algunos días inferior a los 40 de media de un individuo normal. Consecuentemente, el estrato córneo es más grueso y con corneocitos agrupados por algunos desmosomas residuales aún activos. El resultado es la visión de placas de aglomerados de corneocitos constitutivos de la afección.

Efectivamente el tratamiento selectivo de la caspa pasa por la investigación de moléculas citostáticas como las piritionas, Piroctone olamina, etc. que inhiban la duplicación celular de las capas basales, o bien por mantener el tratamiento clásico con queratolíticos que destruyan los desmosomas y enlaces  $\epsilon$ - $\gamma$ -(glutamil)lisina con el fin de realizar una fina descamación que sea imperceptible a la vista.

De la misma forma se investigan patologías de etiología descamativa como el psoriasis y la ictiosis.

muerte celular programada o apoptosis

El término apoptosis deriva del griego y viene a describir, como ocurre con la caída de las hojas de los árboles o los pétalos de una flor, un proceso de regulación natural de la vida. Así, la apoptosis es uno de los mecanismos de muerte en las células eucariotas que, en condiciones de normalidad, puede equipararse a la muerte celular fisiológica o programada. Las células apoptóticas sufren cambios en su citoplasma y núcleo que conducen a su autodestrucción y consecuente eliminación del tejido. Todo ello, sin ocasionar daño alguno a las células colindantes.

Así, la apoptosis puede considerarse como una muerte celular biológica cuya misión esencial sería la eliminación de células innecesarias, dañadas o alteradas. La modificación de este mecanismo, conllevaría consecuentemente un crecimiento celular anormal. En la piel, la apoptosis desempeña un papel destacado en la renovación epidérmica y en el ciclo folicular, así como probablemente en los procesos de cicatrización.

## MUERTE CELULAR

La muerte celular de los queratinocitos está genéticamente regulada salvo en caso de accidente o anomalía. Dependiendo de su regulación genética distinguimos dos tipos de muerte celular en los queratinocitos: muerte celular programada (regulada genéticamente) o muerte celular patológica.

### Muerte celular programada

Genéticamente, las células basales se encuentran programadas para desarrollar dos fenómenos: completar su ciclo vital diferenciándose para formar las distintas estructuras epidérmicas o bien autodestruirse para regular el tránsito celular o por cualquier anomalía generada en la mitosis.

La cinética epidérmica se determina por una serie de factores de crecimiento epidérmicos que regulan la proliferación, diferenciación, queratinización y maduración-desprendimiento celular de los queratinocitos. Las células basales tras pasar por queratinocitos espinosos, granuloso y corneocitos, se desprenden de la epidermis 28/56 días después de su generación por mitosis, bien de forma natural o por rozamiento. El proceso de muerte celular fisiológica, esto es, el tiempo que transcurre desde que una célula basal madre ha originado por mitosis una célula postmitótica hasta su transformación en corneocito se estima en 12 días.

El segundo fenómeno que mediatiza la proliferación celular programada en la epidermis es la apoptosis. Algunos queratinocitos condensan espontáneamente su cromatina en los márgenes de la membrana nuclear y producen a través de una endonucleasa  $Ca^{++}/Mg^{++}$  dependiente, pequeñas masas nucleares formadas por unos fragmentos poliméricos de 180-200 pares de bases. En la membrana celular se forman unas protuberancias que no originan rupturas ni reacción inflamatoria que se denominan *blebs*. Las masas nucleares se fragmentan junto con las estructuras celulares formando unas pequeñas vesículas de membrana con fragmentos nucleares (vesículas apoptóticas), que son fagocitadas por células vecinas o macrófagos.

Este fenómeno se realiza en 48-72 horas, mucho menos tiempo que la homeostasis estructural, y no va acompañado por destrucción lisosómica o de otras organelas vitales; sin embargo, todo el proceso requiere gasto de ATP y síntesis proteica. (Figura 4b)

### **Muerte celular patológica**

Paralelamente, en la epidermis se presenta un segundo fenómeno de ciclo celular. La insolación provoca la formación de *sunburn cells* (queratinocitos inviables por necrosis patológica) originadas bien por la liberación del contenido enzimático lisosómico, por destrucción de su membrana a través de la radiación UV-B, o bien por alteración directa en el ADN nuclear.

Los lípidos de membrana de los lisosomas sufren rotura de sus dobles enlaces y la consecuente alteración de la misma. La alteración de los ácidos grasos insaturados de la pared lisosómica origina la formación de malonildialdehído y dos radicales libres lipoperóxidos que fomentan su degradación y rotura originando unas células que se autodestruyen enzimáticamente.

Los lisosomas dérmicos de los fibroblastos y neutrófilos, al ser destruida su pared, producen también malonildialdehído y dos radicales libres lipoperóxidos que reaccionan con aminoácidos del colágeno, generalmente histidina, arginina y lisina, ocasionando su insolubilidad y en consecuencia fotoenvejecimiento.

Una de las consecuencias más claras de la agresión a las membranas celulares, no sólo de las membranas lisosomiales, es la producción de un pigmento lipoproteico fluorescente denominado lipofuscina. Este pigmento se acumula con la edad actuando como indicador de la senescencia y junto a la hiperplasia melanocítica epidérmica reactiva, hiperqueratosis, necrosis de células epidérmicas y elastosis en la trama de fibras conjuntivas, llegan a generar lentigos seniles.

Ha de distinguirse claramente apoptosis de necrosis celular, en donde la muerte celular se origina previo edema intracelular, alteración de lisosomas y otras estructuras, ruptura de la membrana celular y nuclear y fagocitosis que se realiza por macrófagos, consecuentemente con notable respuesta inflamatoria local y sin necesidad de consumo energético ni síntesis proteica.

## **REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS**

### **Regulación genética**

En condiciones normales la apoptosis está controlada genéticamente. Existen genes inductores e inhibidores de la apoptosis. Hay claras evidencias que demuestran esta aseveración en seres inferiores y se ha demostrado equivalencia con los genes en mamíferos. Así, el gen *ice* induce la apoptosis y el *bcl2* la inhibe. La proteína ICE es una proteasa que activa la interleucina-1 $\beta$  y con efectos opuestos a la BCL-2. Niveles altos de ICE inactivan la BCL-2 y viceversa.

Para que la BCL-2 pueda ejercer su actividad debe unirse a la proteína BAX, de similar secuencia, aunque inductora de la apoptosis. De esta forma, si el predominio es de BCL-2 se inhibe la apoptosis o si es al contrario se favorece.

El gen supresor tumoral p53 también desempeña un papel importante al inducir la apoptosis en diversas circunstancias que amenazan la integridad del ADN.

La cinética epidérmica utiliza la apoptosis como regulación. El queratinocito basal sano y proliferante posee el gen *bcl-2* y cuando pasa a ser célula postmitótica pierde la capacidad de expresarlo, de tal forma que las células suprabasales no lo expresan. Ello conduce al queratinocito postmitótico a una doble posibilidad: continuar diferenciándose para formar la estructura epidérmica o tener un comportamiento autodestructivo (apoptótico).

Parece que la desviación hacia uno u otro camino es debida a la familia de los TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) que inhibirían el crecimiento celular. Se admite que la célula postmitótica (que ya no expresa el gen *bcl-2*) que está sometida a los efectos de los TGF- $\beta$ , sólo se encaminará hacia la apoptosis si es capaz de expresar oncogenes, concretamente el *c-myc*.

El principal hecho involucrado en la génesis del tumor es la inhibición de la apoptosis. Se estimula el desarrollo tumoral mediante la prolongación indefinida de la vida celular y no mediante el estímulo de la proliferación, siendo el principal exponente la presencia del gen *bcl2*. Este aumento en la longevidad de las células neoplásicas facilita el desarrollo de otros oncogenes como el *myc* o/y la inactividad de genes supresores tumorales como p53.

#### Otros mecanismos de regulación

Además del control genético existen otros mecanismos reguladores. Existen multitud de moléculas inductoras de la apoptosis como los corticosteroides, algunos quimioterápicos, el ácido retinoico y TNF (Tumor Necrosis Factor).

La nicotina, que inicialmente no es un alcaloide cancerígeno, participa en la génesis del tumor al inhibir la apoptosis, hecho que favorecería el desarrollo mutagénico de los numerosos carcinógenos presentes en el tabaco.

El calcio y determinados radicales libres reactivos al oxígeno se estudian en la actualidad como estimulantes de la apoptosis.

#### MISIÓN DE LA APOPTOSIS

La apoptosis desempeña un papel primordial desde el estado embrionario. La apoptosis se involucra en la renovación de tejidos que están formados a través de células madres (*stem cells*): sistema inmunitario, células dependientes del sistema hormonal y células ductales de las glándulas exocrinas.

A través de los linfocitos T citotóxicos las células infectadas comienzan un proceso apoptótico por el que se defienden inmunológicamente los tejidos. Una forma similar se desarrolla en los procesos neoplásicos por el TNF.

La apoptosis puede considerarse el mecanismo principal que tienen los tejidos para eliminar las células nocivas, alteradas, inviables o innecesarias y en consecuencia mantener la fidelidad fenotípica.

Ha de recordarse que los queratinocitos aumentan hasta veinticinco veces su tamaño en el tiempo que transcurre desde la capa basal hasta el estrato córneo. En estas condiciones y situación fisiológica ha de considerarse que de no regularse los queratinocitos por apoptosis, el número y volumen de queratinocitos originarían una epidermis mucho más gruesa y llena de prominencias.

En los tejidos con alta y baja proliferación a la vez como la epidermis, es necesaria tanto la potenciación como la inactivación de la apoptosis. Las células basales necesitan un mecanismo por el que se seleccionen las células viables para la formación de las estructuras superiores, de tal forma que se autodestruyan las células con malformaciones o alteradas. Por el contrario, en la epidermis es necesaria la inactivación de la apoptosis para aumentar la longevidad de los melanocitos. Los melanocitos son células inmigrantes epidérmicas con muy escasa capacidad proliferativa por lo que es difícil poder fotografiar sus mitosis.

En consecuencia, la apoptosis se plantea como un mecanismo que regula la fisiología celular, permitiendo el desarrollo de las células normales e impidiendo la viabilidad de las alteradas. La desregulación de este mecanismo genera cutáneamente alteraciones seniles o en casos más severos el desarrollo de los distintos tipos de cáncer de piel.