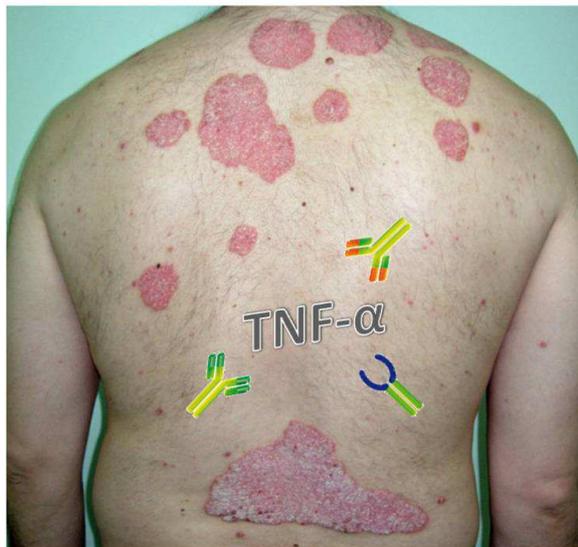




universidad  
de león

## TESIS DOCTORAL

“Tratamiento de psoriasis con  
inhibidores del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ :  
Estudio de los mecanismos de acción.”



Autora:

ALICIA PÉREZ BUSTILLO

FACULTAD DE VETERINARIA / Departamento de Ciencias Biomédicas



universidad  
de león

## TESIS DOCTORAL

“Tratamiento de psoriasis con  
inhibidores del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ :  
Estudio de los mecanismos de acción.”

Autora:

ALICIA PÉREZ BUSTILLO

FACULTAD DE VETERINARIA / Departamento de Ciencias Biomédicas

León, 2014

El director del Departamento de Ciencias Biomédicas,

**D. Juan José García Viéitez**

Los directores de la tesis doctoral,

**José María García Ruíz de Morales**

Servicio de Inmunología. Complejo Asistencial Universitario de León,

**Octavio Miguel Rivero Lezcano**

Unidad de Investigación. Complejo Asistencial Universitario de León,

hacen constar,

Que Alicia Pérez Bustillo ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado:

“Tratamiento de psoriasis con inhibidores del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ :  
Estudio de los mecanismos de acción”,

considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de

Doctor por la Universidad de León.

Las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral han sido financiadas por el Fondo Caja de Burgos de Apoyo a la Investigación Clínica.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este estudio,

A José María García Ruíz de Morales, por ser el guía de este trabajo, por su tiempo, por su dedicación y por su disciplina.

A Octavio Miguel Rivero Lezcano, por guiarme al inicio del proyecto y transmitirme la ilusión por la Investigación.

A Manuel Ángel Rodríguez Prieto, por sus ideas, por su generosidad y por contagiarme de su energía cada mañana.

A Sara Calleja Antolín, por su capacidad docente y por su colaboración en este trabajo.

A Carolina González Cortés, por sus consejos y por su ayuda en la realización de esta tesis.

A Beatriz González Sixto, por compartir su experiencia clínica en el manejo de los pacientes con psoriasis y por ser una excelente compañera.

A todos los compañeros del Servicio de Dermatología e Inmunología, por vuestra colaboración y por los buenos momentos que hemos compartido durante la elaboración de este trabajo.

A mi familia, por vuestro apoyo incondicional y por haberme enseñado el valor del coraje, la tenacidad y la perseverancia.

A Carlos, por estar siempre a mi lado con su sonrisa y eterno optimismo.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS .....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	10
1.1. Epidemiología y clínica de la psoriasis.....	11
1.2. Correlación clínico-patológica.....	13
1.3. Genética y bases inmunológicas de la psoriasis.....	15
1.3.1. Genética.....	15
1.3.2. Desencadenantes de la cascada inflamatoria.....	16
1.3.3. Relación entre el sistema inmune innato y adaptativo.....	18
1.3.4. Desequilibrio Th1, Th2, Th17.....	20
1.3.5. Eje IL-23/Th17.....	22
1.3.6. IL-22, Th22.....	23
1.3.7. Linfocitos T reguladores.....	24
1.4. Tratamiento actual de la psoriasis.....	25
1.4.1. Tratamientos sistémicos convencionales .....	26
1.4.2. Tratamientos biológicos.....	26
1.4.2.1. Inhibidores del TNF- $\alpha$ .....	27
1.4.2.2. Anticuerpo anti-p40 (IL-12/IL-23) .....	31

1.4.2.3. Nuevas dianas terapéuticas .....	31
1.4.3. Búsqueda de biomarcadores en el manejo de la psoriasis.....	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	36
3.1. Diseño del estudio .....	37
3.2. Sujetos del estudio .....	37
3.3. Muestreo.....	43
3.3.1. Muestras sanguíneas .....	43
3.3.1.1. Obtención de suero .....	43
3.3.1.2. Aislamiento de linfocitos en sangre periférica.....	44
3.3.1.3. Purificación de ADN genómico .....	44
3.3.2. Muestras cutáneas .....	45
3.3.2.1. Biopsia cutánea .....	45
3.3.2.2. Pulverización .....	45
3.3.2.3. Disrupción y homogeneización .....	46
3.3.2.4. Purificación del ARN.....	47
3.3.2.5. Medición de la concentración y pureza del ARN .....	48
3.3.2.6. Eliminación de ADN genómico residual.....	48
3.3.2.7. Síntesis de ADN complementario .....	49
3.4. Métodos .....	49
3.4.1. Determinación del ASLO.....	49
3.4.2. Tipaje HLA .....	50

3.4.3. Determinación de la proteína C reactiva y sustancia amiloide A.....	51
3.4.4. Análisis de citoquinas en suero.....	51
3.4.4.1. Análisis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 y VEGF.....	51
3.4.4.2. Análisis de IL-22.....	53
3.4.5. Cuantificación mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	54
3.4.6. Determinación de las subpoblaciones linfocitarias.....	59
3.4.7. Población de linfocitos T reguladores.....	59
3.5. Análisis estadístico.....	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Respuesta clínica.....	63
4.1.1. Respuesta clínica y HLA.....	66
4.1.2. Respuesta clínica y niveles de ASLO.....	66
4.2. Estudio de biomarcadores de inflamación en suero.....	67
4.2.1. Marcadores sistémicos clásicos de inflamación.....	67
4.2.2. Niveles de citoquinas en suero.....	69
4.2.3. Correlación entre citoquinas y marcadores clásicos de inflamación sistémica.....	74
4.2.4. Análisis longitudinal de seguimiento a 30 meses en pacientes sin cambio de biológico.....	75
4.3. Valoración de ARNm de citoquinas en biopsias cutáneas.....	77

4.4. Correlación entre citoquinas en suero y ARNm de citoquinas en piel ...	80
4.4.1. Análisis global de la correlación entre citoquinas en suero y biopsia .....	80
4.4.2. Análisis estratificado de la correlación entre citoquinas en suero y biopsia.....	87
4.5. Estudio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	92
4.5.1. Poblaciones linfocitarias T, B y NK.....	92
4.5.2. Análisis de linfocitos T reguladores.....	93
5. DISCUSIÓN .....	98
6. CONCLUSIONES.....	124
BIBLIOGRAFÍA .....	127

# ABREVIATURAS

A: absorbancia

AbMo: anticuerpo monoclonal

ACT: acitretino

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADL: adalimumab

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: ácido ribonucleico transportador

ASLO: anticuerpos antiestreptolisina O

C: tratamiento continuo

c/: cada

CBA: Cytometric Bead Assay

cél: células

CMH: complejo principal o mayor de histocompatibilidad

CPA: células presentadoras de antígenos

CSA: ciclosporina

$C_t$ : ciclo umbral

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

EF1 $\alpha$ : factor de elongación 1 $\alpha$

EFL: efalizumab

ETN: etanercept

FE: ficoeritrina

h: hora

I: tratamiento intermitente

IFX: infliximab

i.v.: intravenoso

m: mes

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

MTX: metotrexato

ng: nanogramo

nm: nanómetro

PASI: índice de extensión y gravedad de la psoriasis

PCR: proteína C reactiva

PGA: Physician's Global Assessment

PUVA: ultravioleta A con psoraleno

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RCP-TR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

SAA: sustancia amiloide A

s.c. subcutáneo

sem: semana

Treg: linfocitos T reguladores

U: unidades

UA: unidades arbitrarias

UVB-BE: ultravioleta B de banda estrecha

V: voltio

μl: microlitro

μM: micromolar

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características farmacológicas de los anti-TNF comercializados.

Tabla 2. Características de los pacientes antes del tratamiento con inhibidores del TNF- $\alpha$  y tratamiento administrado.

Tabla 3. Cebadores empleados en la RCP-TR.

Tabla 4. Interpretación de los valores de los coeficientes de correlación según el rango de valores.

Tabla 5. Eficacia del tratamiento inicial y tratamientos administrados en el seguimiento a largo plazo.

Tabla 6. Expresión de PCR y SAA en suero, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles tras 16 semanas de tratamiento respecto a su estado basal (t0-t1).

Tabla 7. Resumen de algunas de las citoquinas estudiadas en suero, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles tras el tratamiento (16 semanas) respecto a su estado basal (t0-t1). Se muestran solo aquellas en las que hubo hallazgos relevantes.

Tabla 8. Pacientes que mantienen el tratamiento inicial a las 30 semanas de seguimiento, de forma continua o intermitente.

Tabla 9. Expresión de ARNm de citoquinas en biopsia cutánea, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles tras el tratamiento respecto a su estado basal (t0-t1) (ND: no disponible).

Tabla 10. Linfocitos Treg en sangre periférica, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles individualizados a las 16 semanas de tratamiento respecto a su estado basal (t0-t1).

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Placas eritematosas cubiertas por escama blanca nacarada, distribuidas en cuero cabelludo y superficies extensoras de extremidades.

Figura 2. Paraqueratosis, acantosis y engrosamiento de las crestas interpapilares en forma de porra con coalescencia de las mismas. Vasos dilatados en la dermis superficial, rodeados por un infiltrado inflamatorio formado principalmente por linfocitos (H-E 20x).

Figura 3. A mayor detalle, paraqueratosis con agregados de neutrófilos (Microabscesos de Munro) (H-E 100x).

Figura 4. Relación entre el sistema inmune y adaptativo.

Figura 5. Diferenciación de los diferentes subtipos de linfocitos, y su efecto en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

Figura 6. Tratamiento de la psoriasis moderada-grave. Clásicamente los pacientes recibían de forma rotatoria y secuencial, combinada o no, los tratamientos sistémicos convencionales. La incorporación de los fármacos biológicos ha abierto el camino a los tratamientos continuos.

Figura. 7. Fármacos anti-TNF comercializados actualmente.

Figura 8. Mejoría del PASI en cada grupo de tratamiento a las 16 semanas.

Figura 9. Respuesta clínica a las 16 semanas de tratamiento en el grupo de pacientes tratados con etanercept frente al grupo de pacientes tratados con infliximab o adalimumab.

Figura 10. Paciente con psoriasis en placa severa, antes (A) y tras 16 semanas de tratamiento con infliximab (B).

Figura 11. Niveles de PCR y SAA en suero de controles y pacientes, antes del inicio del tratamiento y a las 16 semanas.

Figura 12. Niveles de TNF- $\alpha$  en suero en controles y pacientes, antes y a las 16 semanas de tratamiento.

Figura 13. Niveles en suero de IL-6, IL-8 y VEGF en controles y pacientes con psoriasis, antes y a las 16 semanas de iniciar tratamiento con un inhibidor del TNF- $\alpha$ .

Figura 14. Niveles en suero de IL-22 en controles y pacientes con psoriasis, antes y a las 16 semanas de tratamiento con un inhibidor del TNF- $\alpha$ .

Figura 15. Niveles en suero de PCR, SAA, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, VEGF e IL-22, en controles y en aquellos pacientes que mantuvieron a largo plazo tratamiento con el mismo inhibidor del TNF- $\alpha$ . Se muestran los datos antes de iniciar tratamiento (t0), a las 16 semanas (t1) y a los 30 meses (t2).

Figura 16. Expresión relativa de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, VEGF, IFN- $\gamma$  e IL-17; y expresión absoluta de IL-22, en biopsia cutánea, en controles y pacientes con psoriasis antes y a las 16 semanas de tratamiento con un inhibidor del TNF- $\alpha$ .

Figura 17. Expresión de TNF- $\alpha$  en suero (pg/ml) y ARNm en piel (UA/ml) de cada paciente.

Figura 18. Expresión de IL-6 en suero (pg/ml) y ARNm en piel (UA/ml) de cada paciente.

Figura 19. Expresión de VEGF (pg/ml) en suero y ARNm en piel (UA/ml) de cada paciente.

Figura 20. Expresión de IL-22 en suero (pg/ml) y ARNm en piel (ng/ $\mu$ l) de cada paciente.

Figura 21. (a) Niveles en suero de TNF- $\alpha$  en pacientes tratados con etanercept o con anticuerpo monoclonal. A la semana 16, los niveles de TNF- $\alpha$  séricos solo se elevan en los pacientes tratados con etanercept. (b) A nivel cutáneo TNF- $\alpha$  solo disminuye en los pacientes tratados con etanercept.

Figura 22. Diferencias en la expresión de VEGF e IL-6 en suero y/o piel en función del tipo de tratamiento recibido: etanercept o anticuerpo monoclonal.

Figura 23. Variaciones en la expresión de VEGF a nivel cutáneo, y de IL-6 e IL-8 en suero de pacientes que alcanzan PASI-90, respecto a los que no.

Figura 24. Variaciones en la expresión de citoquinas en piel y suero en pacientes con psoriasis, en función de la presencia o no de artropatía psoriásica.

Figura 25. Poblaciones de linfocitos CD3+, CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en controles y pacientes, antes del tratamiento y a las 16 semanas.

Figura 26. Selección y distinción de los linfocitos T reguladores y linfocitos T activados.

Figura 27. Linfocitos T activados en controles y pacientes, antes y a las 16 semanas de tratamiento.

Figura 28. Niveles de linfocitos T reguladores en controles y pacientes con psoriasis tratados con inhibidores del TNF- $\alpha$ , antes y a las 16 semanas de tratamiento.

Figura 29. Ejemplo de un paciente tratado con adalimumab, en el que el porcentaje de linfocitos T reguladores aumentó a las 16 semanas de tratamiento.

Figura 30. Porcentaje de Treg en pacientes tratados con etanercept frente a pacientes tratados con anticuerpos monoclonales.

# **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Epidemiología y clínica de la psoriasis**

La psoriasis es una enfermedad frecuente que afecta principalmente a la piel. Se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria crónica mediada inmunológicamente, que cursa con hiperproliferación y diferenciación anormal de queratinocitos. Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, todavía no están claramente establecidos. Gran parte de estos conocimientos han surgido del empleo de fármacos biológicos, que han demostrado gran eficacia clínica y buen perfil de seguridad. Sin embargo, aún se conoce poco de los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción.

La psoriasis se distribuye a nivel mundial, mostrando variaciones étnicas y geográficas. En Europa la prevalencia varía entre el 0,6 y el 6,5%, con una media alrededor del 2%.<sup>1-3</sup> Afecta por igual a hombres y mujeres y puede aparecer a cualquier edad, aunque es más frecuente alrededor de los 20-30 años y entre los 50 y 60.<sup>1</sup>

Existen diversas formas de presentación clínica, siendo la más frecuente la psoriasis en placas. Esta forma afecta al 70-80% de los pacientes con psoriasis y se caracteriza por placas bien delimitadas, eritematosas, cubiertas por escamas gruesas blanquecinas, que afectan principalmente los codos, rodillas, región lumbosacra y cuero cabelludo (fig. 1).<sup>4</sup> La psoriasis en gotas afecta al 10% de los pacientes y se define por el comienzo agudo de pápulas y placas de pequeño tamaño, eritematosas, escasamente descamativas, distribuidas en tronco y extremidades, con evolución generalmente autolimitada.<sup>4</sup> Otras formas

clínicas menos frecuentes son la psoriasis pustulosa y la psoriasis eritrodérmica.<sup>4</sup>



Figura 1. Placas eritematosas cubiertas por escama blanca nacarada, distribuidas en cuero cabelludo y superficies extensoras de extremidades.

Aunque raramente compromete la vida, la psoriasis puede cursar con una elevada morbilidad y disminución de la calidad de vida,<sup>5</sup> ocasionando un gran impacto económico en el sistema sanitario.<sup>6</sup> Las comorbilidades más frecuentemente asociadas con la psoriasis son: artropatía psoriásica, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma y cáncer de piel, ansiedad y depresión.<sup>7</sup>

La artropatía psoriásica se clasifica entre las espondiloartropatías seronegativas asociadas a HLA-B27, y aunque su prevalencia no ha sido claramente establecida se cree que afecta al 25-34% de los pacientes con psoriasis.<sup>8</sup> La forma de presentación más frecuente es la artritis oligoarticular

asimétrica. Además de la presentación articular, puede afectar a tendones, ligamentos y huesos, y con frecuencia se asocia a manifestaciones ungueales.<sup>8</sup> En el 70% de los casos aparece después de las manifestaciones cutáneas y su gravedad no está necesariamente relacionada con la extensión cutánea.<sup>8</sup>

## **1.2. Correlación clínico-patológica**

A nivel individual las placas de psoriasis se caracterizan por descamación, infiltración y eritema. Las escamas son el resultado de una hiperproliferación anómala de queratinocitos que se manifiesta por el engrosamiento de la epidermis (acantosis), la reducción o ausencia de capa granulosa (hipogranulosis), y la retención del núcleo de los queratinocitos en la capa córnea (paraqueratosis) (fig. 2).<sup>9</sup> Los cambios a nivel de la epidermis junto con un denso infiltrado inflamatorio contribuyen a la infiltración de las lesiones. El infiltrado principalmente está compuesto por linfocitos CD4+ y células presentadoras de antígeno (CPA) en la dermis, mientras que en la epidermis predominan los linfocitos CD8+, las células de Langerhans y los neutrófilos (fig. 3).<sup>9</sup> El eritema de las lesiones es debido al aumento de capilares dilatados y tortuosos en la dermis superficial (fig. 2).<sup>9</sup>

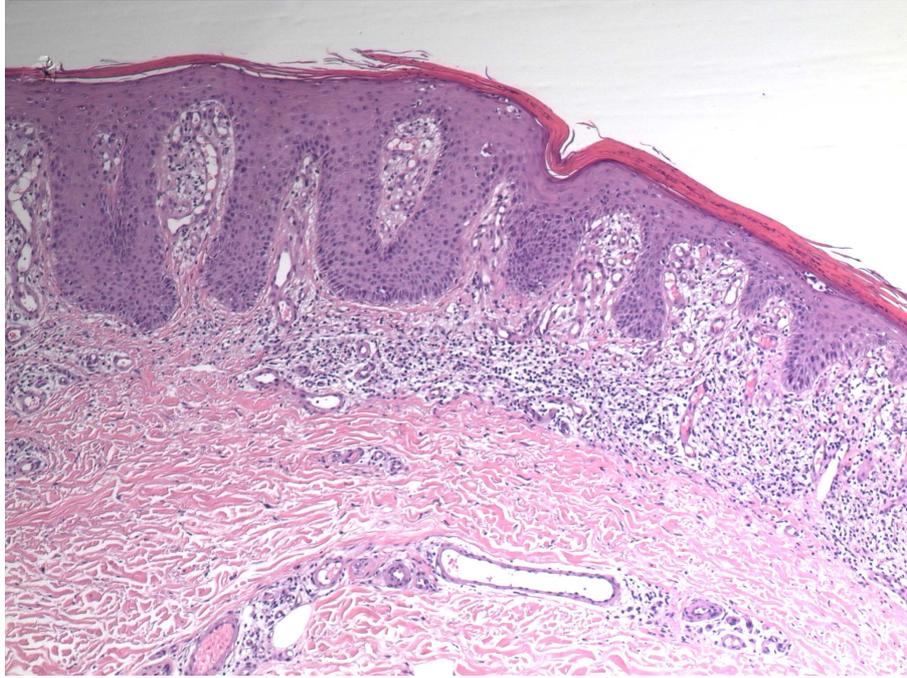


Figura. 2. Paraqueratosis, acantosis y engrosamiento de las crestas interpapilares en forma de porra con coalescencia de las mismas. Vasos dilatados en la dermis superficial, rodeados por un infiltrado inflamatorio formado principalmente por linfocitos (H-E 20x).

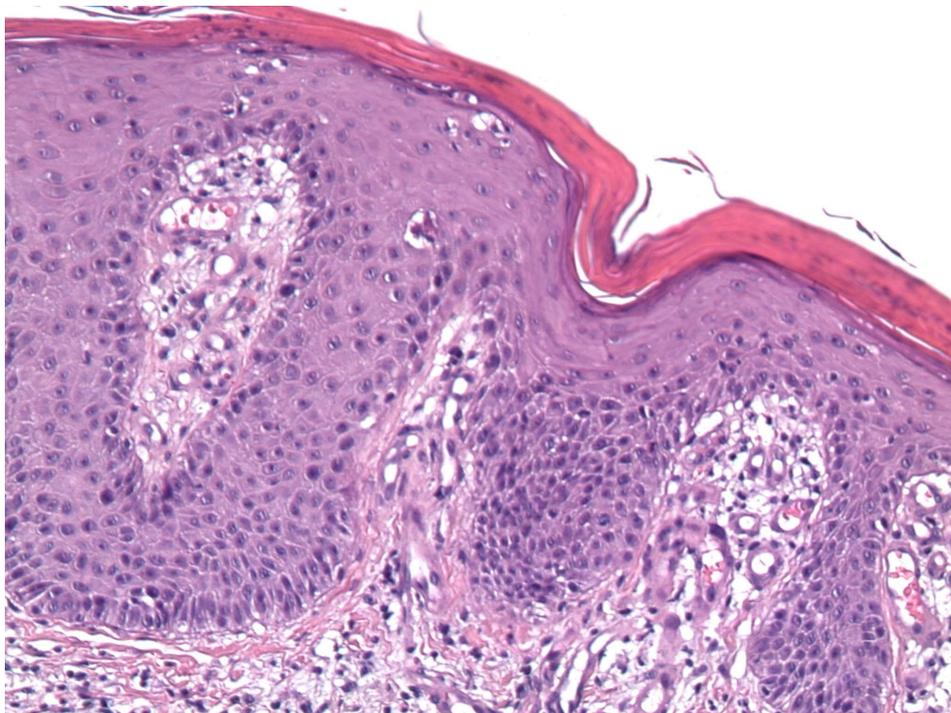


Figura 3. A mayor detalle, paraqueratosis con agregados de neutrófilos (Microabscesos de Munro) (H-E 100x).

### **1.3. Genética y bases inmunológicas de la psoriasis**

La psoriasis se considera una enfermedad multifactorial, influenciada por múltiples genes con penetrancia variable, así como factores ambientales.

#### *1.3.1. Genética*

La contribución del componente genético al desarrollo de la psoriasis se ha establecido mediante estudios de familias afectadas y gemelos, estudios epidemiológicos de población y, más recientemente, mediante la identificación de genes asociados a la enfermedad mediante estudios de ligamiento y asociación.<sup>10-13</sup>

La probabilidad de padecer psoriasis en un individuo aumenta si presenta antecedentes familiares. El riesgo en un descendiente se estima en el 41% si ambos padres están afectados, 14% si un padre está afectado, y 6% si un hermano está afectado.<sup>1</sup> La concordancia para gemelos monocigotos varía del 62% al 70% comparado con el 21-23% para gemelos dicigotos.<sup>2</sup>

Se han identificado varias regiones cromosómicas asociadas a psoriasis, denominadas PSORS1-10, siendo la asociación más fuerte con el locus PSORS1 situado en el cromosoma 6p21, dentro del complejo principal de histocompatibilidad (CMH).<sup>14</sup> Esta región codifica genes importantes en la respuesta inmune, incluyendo genes HLA, así como más de 200 genes no HLA.<sup>1, 2</sup> Varios alelos HLA se han relacionado con la psoriasis, siendo el alelo HLA-Cw6 el que más constantemente ha demostrado un elevado riesgo para psoriasis.<sup>15, 16</sup> En concreto el alelo HLA-Cw\*0602 se ha asociado

principalmente a la psoriasis en gotas y a la psoriasis tipo 1, definida como una forma más grave, con inicio antes de los 40 años, con afectación extensa y recurrente, y con historia de familiares afectados.<sup>1-3, 17</sup> Puesto que la mayoría de las células T epidérmicas son CD8+, es probable que respondan a antígenos presentados en el contexto de moléculas del CMH clase I, como el HLA-Cw6.<sup>18</sup>

Sin embargo, la forma alélica HLA-Cw6 únicamente está presente en el 50-75% de los pacientes con psoriasis, comparado con el 10-15% de la población no psoriásica; y solo el 10% de los portadores del alelo HLA-Cw6 desarrollan la enfermedad.<sup>1, 16</sup> Se han identificado otros genes de susceptibilidad fuera de la región del CMH, que están implicados en la regulación de la inflamación y/o inmunidad, y que pueden contribuir a la severidad y fenotipo de la psoriasis. Algunos de estos genes regulan la vía de señalización IL-23/IL-17 (IL-23A, IL12B, IL23R); la respuesta inmunitaria Th2 (IL4, IL13); la vía de señalización NFκB; y moléculas de defensa y diferenciación epidérmica (β-defensina 4 (DEFB4), proteínas de envoltura queratinizada tardía (LCE)).<sup>19</sup>

### *1.3.2. Desencadenantes de la cascada inflamatoria*

Múltiples factores ambientales se han implicado en la patogenia de la psoriasis, destacando las infecciones, los fármacos, el estrés emocional, los traumatismos (fenómeno de Koebner) y el tabaco.<sup>1</sup>

El factor ambiental mejor caracterizado es la infección faríngea por *Streptococcus pyogenes*. Se ha relacionado con el desencadenamiento de brotes de psoriasis en gotas, pero también con la exacerbación de psoriasis

crónica en placas preexistente.<sup>20-23</sup> Su implicación en la etiopatogenia de la psoriasis se evidencia por la frecuente historia de infección faríngea las dos semanas previas al brote o exacerbación, el aislamiento del organismo en el exudado faríngeo y la elevación de los anticuerpos antiestreptococo.<sup>20</sup>

En cualquier caso, la naturaleza exacta del antígeno responsable de la activación de las células T patógenas permanece desconocida, postulándose el papel de superantígenos, antígenos estreptocócicos y antígenos cutáneos relacionados estructuralmente con antígenos estreptocócicos o no.<sup>24, 25</sup>

En el contexto de una infección estreptocócica faríngea, los antígenos estreptocócicos serían presentados en el contexto del HLA-Cw6 a los linfocitos T naïve (Th0) de los ganglios linfáticos que drenan la faringe, causando su diferenciación y proliferación a linfocitos T efectores y de memoria con capacidad de emigrar a la piel, donde serían activados.<sup>18, 20</sup> El principal antígeno estreptocócico reconocido como desencadenante de psoriasis es el peptidoglicano, un constituyente de la membrana celular.<sup>18, 20</sup>

Es posible que inicialmente la respuesta esté mediada por linfocitos T específicos de antígenos estreptocócicos, y que con el tiempo las células T pierdan la tolerancia inmunológica, reconociendo antígenos propios, y perpetuando de este modo la cronicidad de la enfermedad.<sup>18</sup> Se conoce que epítomos de la proteína M estreptocócica presentan homología con las queratinas K16 y K17, y que se unen preferentemente al HLA-Cw6.<sup>18, 20</sup>

Se ha observado que las infecciones, los traumatismos en la piel y la inflamación desencadenan la expresión de péptidos antimicrobianos en los queratinocitos. En las placas de psoriasis se identifican:  $\beta$ -defensinas,

proteínas S100, catelicidina (LL37), ARNasa y lisozima.<sup>26</sup> Estas junto con las proteínas pequeñas ricas en prolina y las proteínas de envoltura queratinizada tardía (LCE), también aumentadas en psoriasis, podrían actuar como nuevos antígenos. Algunas de estas proteínas están codificadas por genes localizados en el complejo de diferenciación epidérmica en el cromosoma 1q21, que ha sido relacionado con susceptibilidad genética para la psoriasis (PSORS4).<sup>18, 27</sup>

### *1.3.3. Relación entre el sistema inmune innato y adaptativo*

Las principales células del sistema inmune innato en la piel son las células dendríticas, los macrófagos, los queratinocitos y los neutrófilos.<sup>26</sup>

Se sugiere que el inicio de la enfermedad es mediado por las células dendríticas, las más potentes CPA. Tras su activación por señales del sistema inmune innato a través de receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores toll-like, maduran y migran a los órganos linfoides. Allí presentan el antígeno a los linfocitos T naïve (Th0), promoviendo su diferenciación a células efectoras y de memoria con distintos patrones de citoquinas (fig. 4). Además durante este proceso las células T adquieren moléculas que determinan su migración posterior al tejido específico del que procede el antígeno, donde serán de nuevo activadas por el estímulo antigénico. Si el origen es cutáneo, expresarán CLA y CCR4.<sup>28-30</sup>

Las células dendríticas plasmacitoides son un subgrupo de células dendríticas que están aumentadas en las lesiones de psoriasis y que se caracterizan por la elevada producción de IFN- $\alpha$ . El IFN- $\alpha$  tiene múltiples funciones proinflamatorias incluyendo la regulación de la expresión de moléculas del

CMH clase I, favorece la presentación de antígenos y la activación de células T.<sup>31, 32</sup> Además existe una población compleja de células dendríticas mieloides en la piel de los pacientes con psoriasis. Estas células producen un aumento marcado de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-23); aumentan la capacidad de presentar antígenos a las células T; estimulan la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  por los linfocitos T; y aumentan la expresión de la sintasa óxido nítrico inducible (iNOS), generadora de óxido nítrico, con efectos en la vasodilatación, inflamación y con actividad antimicrobiana.<sup>31, 32</sup>

Así, por ejemplo, se ha observado que la catelicidina (LL37) forma complejos con el ADN de células dañadas que, a través del TLR9, se unen a las células dendríticas plasmacitoides, estimulando la producción de IFN- $\alpha$ , implicado en la iniciación de las lesiones de psoriasis.<sup>33</sup> Además LL37 forma complejos con el ARN, activando el TLR7 y, al igual que el complejo LL37-ADN, desencadena la secreción de IFN- $\alpha$  en las células dendríticas plasmacitoides.<sup>34</sup> Por otro lado, el complejo LL37-ARN a través del TLR8 también estimula las células dendríticas mieloides.<sup>34</sup>

Por otro lado, los queratinocitos producen altas cantidades de péptidos antimicrobianos que, además de su actividad antimicrobiana, tienen propiedades inhibitorias de proteinasas, quimioquinas y neuropéptidos. Estas les permiten contribuir a la patogénesis de la psoriasis reclutando células inmunitarias, mediando respuesta inmune proinflamatoria e iniciando la proliferación de queratinocitos y vasos sanguíneos.<sup>26, 35</sup> Los queratinocitos además son sensibles a las citoquinas derivadas de las CPA y los linfocitos T, y como respuesta incrementan aún más las citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y quimioquinas (IL-8 [CXCL8], CXCL10, CCL20).<sup>36</sup>

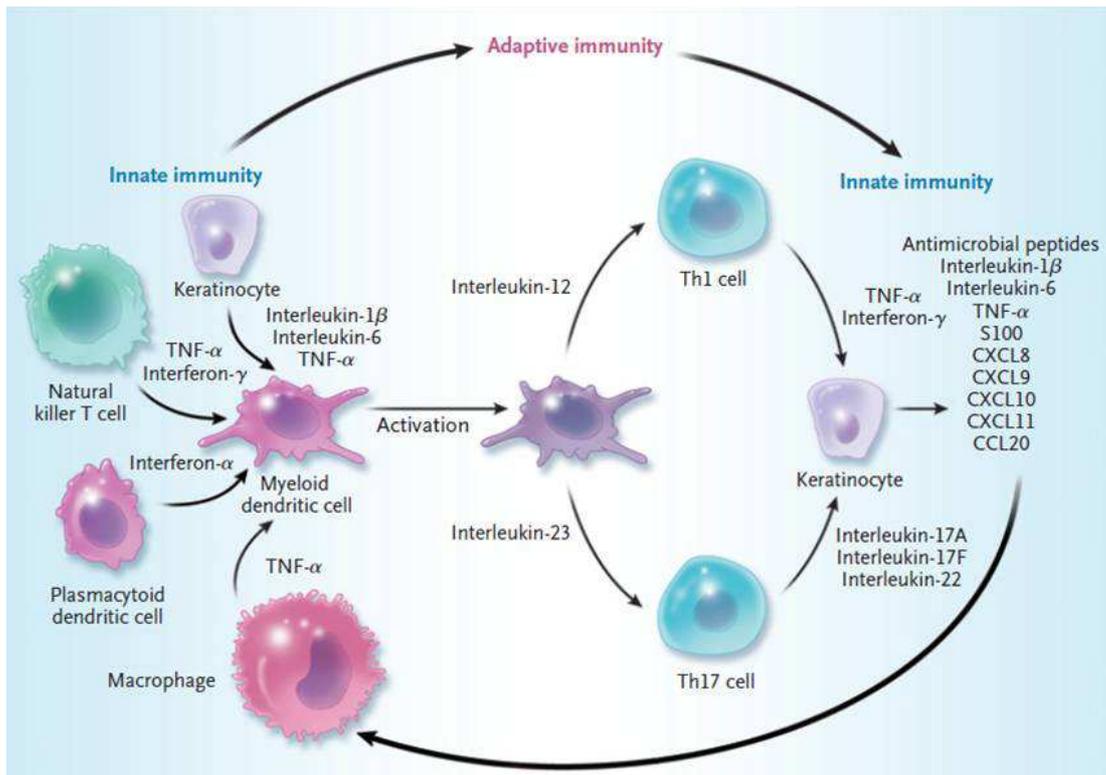


Figura 4. Relación entre el sistema inmune y adaptativo. Tomada de: Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. N Engl J Med. 2009; 361(5): 496-509.

#### 1.3.4. Desequilibrio Th1, Th2, Th17

Durante la activación de las células Th naïve (Th0) en los órganos linfoides secundarios, la diferenciación hacia un tipo de respuesta Th efectora es dependiente del perfil de citoquinas presente localmente (fig. 5).<sup>30</sup> Inicialmente se creyó que la alteración inmunológica primaria en la psoriasis era un exceso de IL-12 (p35/p40), y un defecto de IL-4, causantes de un desequilibrio en los linfocitos Th1/Th2.<sup>37</sup> Posteriormente, la detección de niveles elevados de IL-23 (p19/p40), IL-17 e IL-22 en las lesiones de psoriasis, junto con la detección de polimorfismos en varios genes de la vía IL-23, condujeron al reconocimiento del papel fundamental de las células Th17 en la patogénesis de la psoriasis.<sup>38, 39</sup>

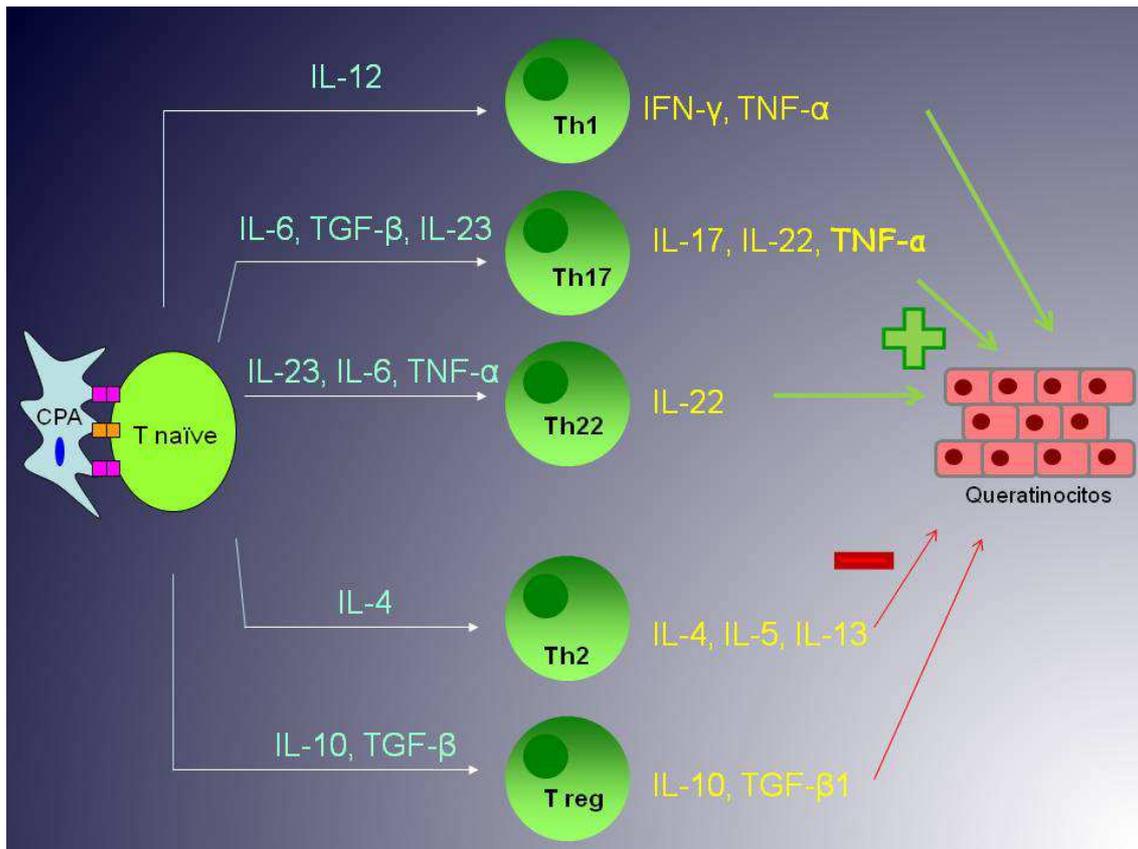


Figura 5. Diferenciación de los diferentes subtipos de linfocitos, y su efecto en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

Se ha demostrado que las lesiones de psoriasis contienen un exceso de linfocitos Th1 que son activados y producen principalmente IFN- $\gamma$ .<sup>40, 41</sup> El IFN- $\gamma$  regula una gran cantidad de genes implicados en las distintas fases de la patogenia de la psoriasis: activación de las células dendríticas, activación de células T, tráfico de leucocitos a través de la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión, vasodilatación, y alteración de los queratinocitos.<sup>41, 42</sup> Entre las funciones del IFN- $\gamma$  se incluye estimular la producción de IL-23 por las células dendríticas, citoquina inductora de la respuesta Th17.<sup>15</sup> Además se ha observado que IFN- $\gamma$  e IL-17 actúan sinérgicamente aumentando las citoquinas proinflamatorias en los queratinocitos.<sup>43</sup> Así el nuevo modelo IL-23/Th17 integra

también el modelo de inflamación Th1, de modo que la placa de psoriasis sería un patrón de respuesta cutánea a diferentes citoquinas producidas por distintos subtipos de células T (fig. 5).

Por otro lado, las células Th2, productoras de IL-4 e IL-13, suprimen la diferenciación y la actividad efectora de las células Th1 y Th17, habiéndose descrito también una disminución de este subgrupo celular en las lesiones de psoriasis.<sup>15, 37</sup>

#### *1.3.5. Eje IL-23/Th17*

Los linfocitos Th17 se definen por la capacidad de secretar IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 y TNF- $\alpha$ .<sup>44</sup> Aunque los mecanismos involucrados en su diferenciación desde los precursores Th naïve (Th0) son controvertidos, TGF- $\beta$ 1, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-21 parecen implicadas en su origen. Su posterior expansión, supervivencia y funciones efectoras están mediadas por la IL-23, producida por las células dendríticas, queratinocitos y macrófagos.<sup>44-46</sup>

La expresión aumentada de genes de la vía IL-23/Th17 en psoriasis conlleva los siguientes efectos:<sup>47</sup> 1) Aumento de la expresión de moléculas de defensa innata como los péptidos antimicrobianos ( $\beta$ -defensinas, catelicidina (LL37)) que pueden actuar como inductores de inflamación.<sup>48, 49</sup> 2) La IL-17 también actúa como una potente citoquina proinflamatoria, estimulando la producción de factores angiogénicos y de quimioquinas para la atracción de células T, neutrófilos y células mononucleares a las lesiones.<sup>48, 49</sup> 3) La IL-17 estimula la producción de IL-6 por los fibroblastos activando un feedback positivo que favorece la diferenciación de nuevos linfocitos Th17.<sup>45</sup>

### 1.3.6. IL-22, Th22

La IL-22 es una citoquina de la familia IL-10, producida por células del sistema inmune innato y adaptativo que, sin embargo, no expresan receptor para IL-22. Su producción mayoritaria se atribuyó inicialmente a los linfocitos Th17, aunque posteriormente se ha observado un subgrupo de células productoras de IL-22, que no coexpresan IL-17 ni IFN- $\gamma$ , denominándose células Th22 (fig. 5).<sup>50-52</sup> Por lo tanto, Th17 y Th22, junto con células epiteliales epidérmicas, serían las principales fuentes de IL-22. La diferenciación a Th22 está inducida por IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-23, citoquinas que a menudo están aumentadas en la piel de pacientes psoriásicos.<sup>50, 53</sup> Un estudio reciente ha demostrado que la expresión de IL-22 tanto en piel como circulante en pacientes con psoriasis está elevada, aunque sus niveles no siempre se correlacionan con la actividad clínica de la psoriasis.<sup>54</sup>

En la piel, y a diferencia de otras citoquinas como IL-17, la principal función de la IL-22 es inducir hiperproliferación de queratinocitos y su diferenciación anormal.<sup>55-57</sup> De modo que en las fases iniciales de la psoriasis el TNF- $\alpha$ , el IFN- $\gamma$  y la IL-17 inducirían la infiltración cutánea por células inflamatorias y favorecerían la presentación del antígeno; mientras que en fases más tardías IL-22 sería el mediador final responsable de las alteraciones de los queratinocitos.<sup>55, 58</sup> Sin embargo, IL-22 también contribuye a la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, incluyendo IL-6, y de marcadores de inflamación sistémica como la sustancia amiloide A (SAA).<sup>53, 59</sup> De forma paradójica se ha relacionado con la supervivencia y reparación del tejido cutáneo.<sup>53, 60</sup> La naturaleza dual de esta proteína probablemente

dependa del ambiente tisular y del perfil de citoquinas en el que actúe.<sup>60</sup> Además actúa sinérgicamente con TNF- $\alpha$  e IL-17 para aumentar la expresión de péptidos antimicrobianos y la producción de quimioquinas.<sup>55, 61</sup>

### *1.3.7. Linfocitos T reguladores*

Los linfocitos T reguladores (Treg) representan uno de los mecanismos desarrollados por el sistema inmune para mantener la autotolerancia frente a antígenos propios, y para asistir en la resolución de la inflamación, manteniendo la homeostasis de los tejidos.<sup>62</sup> Parece que los Treg son capaces de controlar todos los pasos del proceso inmune desde la expansión de la población autorreactiva, la diferenciación, e invasión tisular, hasta las funciones efectoras en el lugar de inflamación.<sup>63</sup> Uno de los mecanismos más importantes por los que ejercen su actividad inmunorreguladora es la inhibición de la maduración, activación y función de las CPA (células dendríticas, macrófagos o células B), conduciendo a la disminución de la proliferación y activación de grupos de células T autorreactivas (Th1, Th17, Th22).<sup>64</sup> Estas acciones son ejercidas modulando la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie celular, la reducción de citoquinas inflamatorias, la liberación de citoquinas inmunorreguladoras, como IL-10 y TGF- $\beta$ , y la apoptosis de células efectoras y CPA.<sup>64, 65</sup>

Estos mecanismos protectores parecen insuficientes en enfermedades desencadenadas por antígenos propios. Una de las causas de este tipo de enfermedad sería la reducción en el número de Treg. Sin embargo, los datos sobre el número de Treg en sangre periférica han sido contradictorios en

muchas enfermedades, incluida la psoriasis.<sup>66, 67</sup> Una de las causas que explicaría estas diferencias es la diferente metodología utilizada para la identificación y purificación de Treg. Durante muchos años los Treg se han identificado como linfocitos T CD4+CD25+. Sin embargo, posteriormente se observó que CD25 no es un marcador específico, puesto que también se expresa en células T activadas. En la actualidad, el factor de transcripción FoxP3 es la molécula más específica para caracterizar los Treg, dependiendo de él la represión de otros marcadores, como CD127, también utilizados en su caracterización.<sup>65, 68, 69</sup>

Además de la disminución en el número de Treg, otras posibilidades en el desencadenamiento de enfermedades inflamatorias son la disminución de la actividad antiinflamatoria de los Treg, es decir, de su función; o la existencia de un acúmulo de células T autorreactivas resistentes a la regulación.<sup>64</sup> Se ha observado que las CPA a través de la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-23 pueden alterar la función de los Treg, a la vez que aumentan la actividad de las células T patógenas (Th1, Th17, Th22).<sup>64</sup>

#### **1.4. Tratamiento actual de la psoriasis**

A la vez que ha avanzado el conocimiento de la etiopatogenia de la psoriasis, la eficacia terapéutica en psoriasis ha progresado de forma paralela. El mejor conocimiento de las bases inmunológicas de la psoriasis ha permitido el diseño específico y la posterior utilización en la práctica clínica de nuevos agentes

terapéuticos, los fármacos biológicos.<sup>70, 71</sup> Esto contrasta con el desarrollo de los tratamientos sistémicos clásicos basados en descubrimientos al azar.<sup>72</sup>

#### *1.4.1. Tratamientos sistémicos convencionales*

Los tratamientos sistémicos convencionales utilizados en psoriasis moderada o grave son acitretino, ciclosporina, metotrexato y fototerapia (fig. 6).<sup>73-76</sup> Estos tratamientos no consiguen eficacia en todos los pacientes, y están asociados a potenciales efectos secundarios graves, sobretudo en tratamientos prolongados. Esto supone un obstáculo en el contexto de una enfermedad crónica como la psoriasis. Como consecuencia, la terapia rotatoria, combinada y secuencial ha sido muy utilizada durante años para disminuir el riesgo asociado.<sup>72</sup>

#### *1.4.2. Tratamientos biológicos*

A diferencia de los tratamientos sistémicos convencionales, los tratamientos biológicos ofrecen nuevas opciones terapéuticas más selectivas que pueden minimizar los efectos secundarios, y como resultado, permitir tratamientos a largo plazo.<sup>71</sup>

En la actualidad, existen 4 agentes biológicos aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como tratamiento para pacientes adultos con psoriasis moderada a grave: tres dirigidos a bloquear la citoquina TNF- $\alpha$ , y un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra la subunidad p40 de IL-12 e IL-23 (fig. 6).<sup>77</sup>

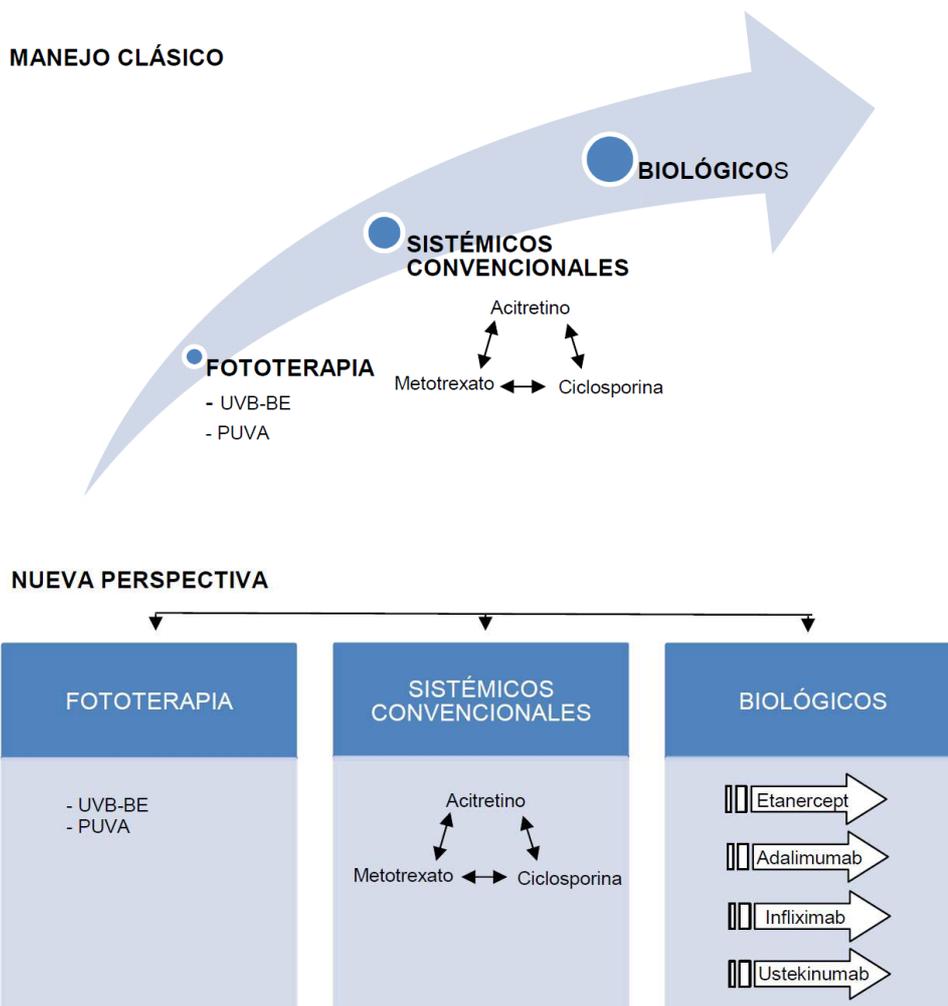


Figura 6. Tratamiento de la psoriasis moderada-grave. Clásicamente los pacientes recibían de forma rotatoria y secuencial, combinada o no, los tratamientos sistémicos convencionales. La incorporación de los fármacos biológicos ha abierto el camino a los tratamientos continuos.

#### 1.4.2.1. Inhibidores del TNF- $\alpha$

Actualmente hay 5 fármacos anti-TNF comercializados (fig. 7). De ellos, solo tres tienen indicación aprobada en psoriasis: una proteína de fusión (etanercept) y dos anticuerpos monoclonales: infliximab (quimérico) y

adalimumab (humano). Aunque la eficacia clínica de los tres anti-TNF ha sido probada en los ensayos clínicos y a través de la experiencia real, todavía no se conocen con exactitud sus efectos biológicos específicos y las vías fisiopatológicas que modifican para resolver la enfermedad.<sup>78</sup> También es incierto por qué los tres inhibidores del TNF- $\alpha$  presentan diferentes perfiles de eficacia y seguridad. Etanercept, a diferencia de los anticuerpos monoclonales, no es útil en la enfermedad inflamatoria intestinal; en psoriasis, a la semana 12 presenta menor porcentaje de pacientes que alcanzan PASI-75; y presenta menor incidencia de tuberculosis como efecto secundario.<sup>79</sup> Estas diferencias podrían explicarse por diferentes mecanismos de acción, farmacología o farmacocinética (tabla 1).<sup>79</sup>

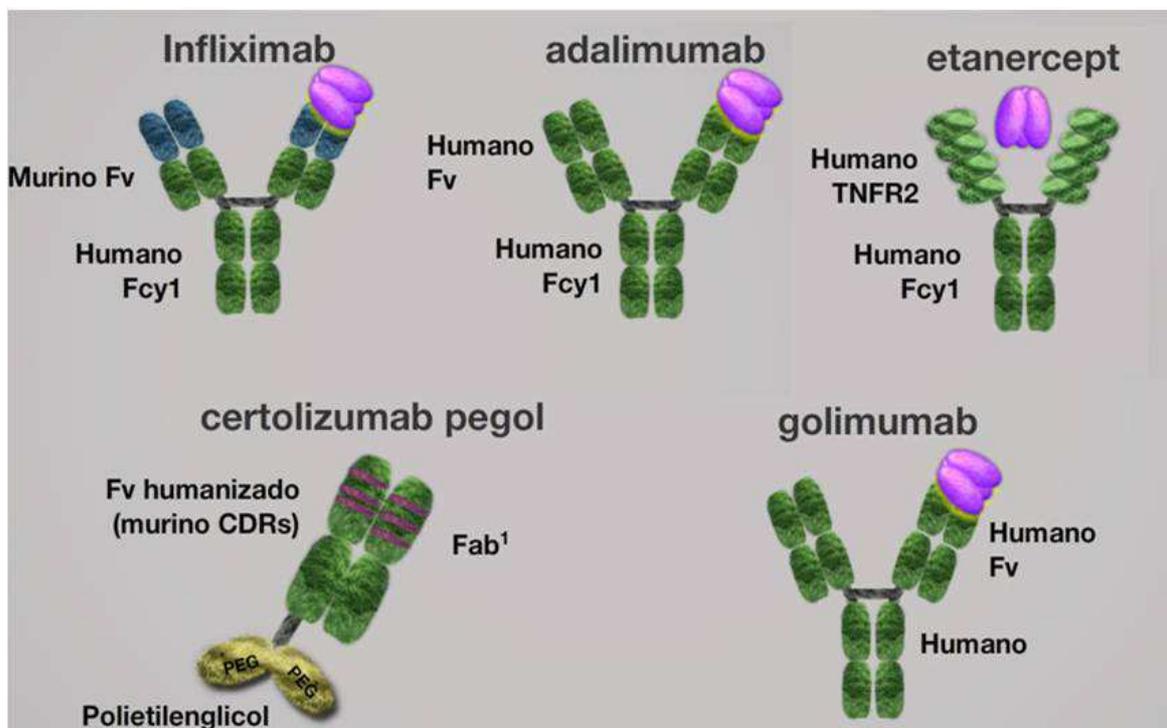


Figura 7. Fármacos anti-TNF comercializados actualmente.

Tabla 1. Características farmacológicas de los anti-TNF comercializados.

Características farmacológicas	Infliximab	Etanercept	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab pegol
Vida media	8-10 días	3-5,5 días	14 días	12±3 días	13±2,6 días
Diana	TNF	TNF, linfoxina	TNF	TNF	TNF
Estructura	Anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino	Proteína de fusión receptor humano p75 TNF	Anticuerpo monoclonal recombinante humano	Anticuerpo monoclonal humano	Fragmento Fab' de anticuerpo humanizado recombinante conjugado con polietilenglicol
Complemento	++	-	+	+	-
Citotoxicidad	+	-	+	+	-
Señalización inversa	+	-	+	+	-
Administración y dosis	i.v., 5 mg/kg, sem 0-2-6, c/8sem	s.c., 25 mg 2v/sem o 50 mg 1v/sem Alternativa: 50 mg 2v/sem dur 12 sem, seguido de 25 mg 2v/sem o 50 mg 1v/sem	s.c. 80 mg sem0, 40 mg sem1 y c/2sem	s.c., 50 mg/m	s.c. 400 mg sem 0-2-4, 200 mg/2 sem

Se ha observado que las diferencias estructurales entre la proteína de fusión y los anticuerpos monoclonales se traducen en diferencias en la especificidad de unión y en las características funcionales.<sup>80</sup> En primer lugar, etanercept, a diferencia de infliximab y adalimumab, se une no solo al TNF- $\alpha$ , sino también a la linfoxina- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ). En segundo lugar, infliximab se une a monómeros y trímeros de TNF- $\alpha$  soluble, mientras que la unión de etanercept se restringe a los trímeros. En tercer lugar, infliximab forma complejos con TNF- $\alpha$ , tanto en la forma soluble como transmembrana, mucho más estables que etanercept, lo que resulta en que etanercept libera TNF- $\alpha$  disociado con actividad biológica; y aunque tanto infliximab como etanercept inhiben la activación mediada por el TNF- $\alpha$  transmembrana, infliximab lo hace de forma más eficaz.<sup>80</sup> Por último, se

ha observado que infliximab y adalimumab, a diferencia de etanercept, inducen lisis de las células que producen TNF- $\alpha$  mediante la fijación del complemento o citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Este mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales probablemente se vea favorecido por la formación de grandes complejos en su interacción con el TNF- $\alpha$ .<sup>81, 82</sup>

Estudios de farmacogenómica en modelos *in vitro* de inflamación apoyan las diferencias en el mecanismo de acción entre la proteína de fusión y los anticuerpos monoclonales. Haider y col. han demostrado que tan solo 29 genes son suprimidos de forma paralela por etanercept e infliximab, siendo genes principalmente implicados en el desarrollo de las células T y en la vía del óxido nítrico. Etanercept suprime 55 genes, principalmente citoquinas producidas por las células Th2 (IL-4, IL-5); e infliximab modula en exclusividad 513 genes, muchos correspondientes a la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12-receptor  $\beta$ 2).<sup>83</sup>

Varios estudios en pacientes con psoriasis apoyan que los anti-TNF ejercen sus efectos disminuyendo el infiltrado celular a través de la disminución de moléculas de adhesión y de la angiogénesis; disminuyendo la producción de citoquinas; y alterando la presentación a las células T y su activación.<sup>78, 84-86</sup> Sin embargo, no existen estudios *in vivo* en psoriasis que comparen los efectos del etanercept con los anticuerpos monoclonales, capaces de explicar los diferentes perfiles de eficacia y por qué un paciente que no responde a uno de los inhibidores del TNF- $\alpha$  puede responder a otro.

#### *1.4.2.2. Anticuerpo anti-p40 (IL-12/IL-23)*

La incorporación al arsenal terapéutico del ustekinumab, el anticuerpo monoclonal que neutraliza la subunidad compartida p40 de la IL-12 y la IL-23, ha supuesto una nueva opción terapéutica con un mecanismo de acción diferente y más selectivo, mostrando eficacia incluso en pacientes que previamente no han respondido a anti-TNF.<sup>87</sup> Sin embargo, al igual que los inhibidores del TNF- $\alpha$ , no consigue respuesta en el 100% de los pacientes.<sup>87</sup>

#### *1.4.2.3. Nuevas dianas terapéuticas*

En la actualidad se están investigando nuevos fármacos dirigidos a dianas más selectivas dentro de la cascada patogénica de la psoriasis con resultados prometedores. De especial interés es el bloqueo de la vía Th17. Tres fármacos dirigidos a esta vía han mostrado buena eficacia y seguridad a corto plazo en ensayos clínicos en fase II.<sup>88-90</sup> El brodalimumab inhibe múltiples miembros de la familia de citoquinas IL-17 a través del antagonismo del receptor IL-17RA; mientras ixekinumab y secukinumab neutralizan específicamente la IL-17A.<sup>88-90</sup>

#### *1.4.3. Búsqueda de biomarcadores en el manejo de la psoriasis*

Dado que la psoriasis es una enfermedad crónica, en ocasiones acompañada de una elevada morbimortalidad, con frecuencia los pacientes reciben a lo largo de la vida todas las opciones terapéuticas disponibles. En la práctica clínica el dermatólogo selecciona qué fármaco es el más conveniente en cada momento en función de la enfermedad, el paciente y los efectos secundarios de cada

fármaco.<sup>91</sup> A la vez que han mejorado los conocimientos en la etiopatogenia de la enfermedad y con el desarrollo de nuevos fármacos se ha puesto empeño en encontrar algún biomarcador que realmente se correlacione con la actividad clínica de la psoriasis, y sea útil para monitorizar el inicio, el progreso y la respuesta a tratamientos.<sup>92, 93</sup> Sin embargo, dada la complejidad de la patogénesis de la psoriasis y de los diferentes mecanismos de acción de los fármacos empleados, ninguno de los biomarcadores no invasivos comúnmente empleados es de utilidad.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis:

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica que evoluciona en brotes. Los fármacos anti-TNF han supuesto un avance en el tratamiento de las formas moderadas-severas de la enfermedad. Dado su mecanismo de acción actuando sobre una molécula clave de la respuesta inmune, es posible que además de una potente acción antiinflamatoria puedan ejercer una acción inmunomoduladora. En la práctica, el principal criterio que se utiliza para tomar decisiones terapéuticas es el criterio clínico. Pero es posible que la clínica no refleje por completo la actividad biológica de la enfermedad. El estudio del patrón de citoquinas producidas a nivel cutáneo y de los niveles séricos circulantes podría contribuir a entender mejor la fisiopatología de la enfermedad y de sus complicaciones. El estudio seriado de los niveles plasmáticos de determinadas citoquinas podría ser útil en la monitorización de la actividad de la enfermedad y de la respuesta a los fármacos anti-TNF y, por tanto, podrían ser biomarcadores no invasivos que ayudasen a un mejor manejo de los pacientes con psoriasis.

## Objetivos:

1.- Estudiar basalmente el perfil inmunológico e inflamatorio a nivel cutáneo y sistémico de los pacientes con psoriasis moderada-grave, en comparación con controles sanos.

2.- Analizar el efecto clínico e inmunológico tanto a nivel cutáneo como sistémico del tratamiento con inhibidores del TNF- $\alpha$  tras una fase de inducción de 16 semanas.

3.- Comparar la respuesta clínica e inmunológica de los pacientes psoriásicos que reciben tratamiento con fármacos anti-TNF del tipo anticuerpo monoclonal (infliximab, adalimumab) y de los que reciben proteína de fusión (etanercept).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. Diseño del estudio**

Se diseñó un estudio prospectivo, observacional, en dos fases. Tras la evaluación inicial de los pacientes antes del tratamiento con un inhibidor del TNF- $\alpha$ , se realizó un estudio de corte transversal a las 16 semanas de tratamiento (fase de inducción). Esta primera fase incluyó un total de 20 pacientes. Ese estudio se completó con otro de seguimiento longitudinal hasta los 30 meses, que incluyó a los 6 pacientes que en ese momento recibían tratamiento continuo o intermitente con el mismo anti-TNF inicial y mantenían la respuesta clínica inicial.

### **3.2. Sujetos del estudio**

Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes de ambos sexos y cualquier edad en seguimiento en la unidad de biológicos del servicio de Dermatología del Complejo Asistencial Universitario de León que presentaban psoriasis moderada a grave y no habían respondido, o presentaban contraindicación o intolerancia a otros tratamientos sistémicos, incluyendo foto(quimio)terapia, acitretino, metotrexato y ciclosporina. La psoriasis moderada a grave se definió como aquella que cumplía alguna de las siguientes condiciones: no controlable con tratamiento tópico, formas extensas, PASI $\geq$ 10, empeoramiento rápido, compromiso de áreas visibles, limitación funcional, percepción de gravedad subjetiva, o asociación con artropatía psoriásica. El intervalo de tiempo de recogida de datos fue de tres años y nueve meses, desde Abril de 2008 a Enero de 2012, incluyéndose en el estudio 20 pacientes.

Se excluyeron del estudio pacientes con psoriasis en gotas, eritrodérmica o pustulosa; pacientes que tras la evaluación inicial mostraron contraindicaciones

para el tratamiento con anti-TNF según su ficha técnica; y aquellos que no aceptaron o revocaron el consentimiento informado del estudio.

A nivel basal (t0) se recogieron los datos demográficos de los pacientes, incluyendo la edad y el sexo, la edad de inicio de la enfermedad, la actividad clínica de la psoriasis evaluada mediante el índice de extensión y gravedad de la psoriasis (PASI), la presencia o no de afectación articular (en función de si en la entrevista clínica el paciente refería enfermedad inflamatoria musculoesquelética concomitante según los criterios del American College of Rheumatology (ACR)) y los tratamientos sistémicos previos (tabla 2). Los datos de edad, duración de la enfermedad y PASI se expresan como media (rango). La edad media fue de 42 años (17-58) y la distribución por sexo mostró un predominio masculino (H:M, 14:6). Los pacientes presentaron una duración media de la enfermedad de 17 años (5-38). El PASI medio fue 12,4 (7,2-23,3), mostrando afectación articular ocho de los pacientes. Los tratamientos sistémicos previos incluyeron foto(quimio)terapia (n=14); fármacos convencionales (acitretino (n=8), metotrexato (n=11), ciclosporina (n=5)); y tratamientos biológicos (efalizumab (n=3), inhibidores del TNF (n=5)) (tabla 2).

La decisión para administrar uno u otro inhibidor del TNF- $\alpha$  fue individualizada para cada paciente y tomada por el dermatólogo responsable de la unidad de biológicos del servicio de Dermatología. La elección se realizó teniendo en cuenta diversos parámetros. En primer lugar, las características clínicas del paciente tales como la edad, el sexo, el peso, las comorbilidades asociadas, la presencia de artritis y el riesgo de posibles efectos adversos. En segundo lugar, las características de la enfermedad: a) desde un punto de vista histórico: tratamientos previos, rapidez de la recaída tras el tratamiento, carácter

intermitente o continuado de la actividad de la enfermedad; y b) en el momento de la prescripción: actividad (PASI), intensidad del componente inflamatorio, ritmo de empeoramiento (inestabilidad) de la psoriasis. Y en tercer lugar, las preferencias del paciente en cuanto a posología y perfil de eficacia/seguridad.

Tanto el etanercept como el adalimumab se administraron de forma ambulatoria vía subcutánea por el propio paciente, en forma de jeringa o pluma precargada, respectivamente. El infliximab se administró en la unidad de día del hospital en perfusión intravenosa. Nueve pacientes fueron tratados con etanercept, 7 de ellos con dosis de 50 mg dos veces a la semana, y los 2 restantes con dosis de 50 mg una vez a la semana. La pauta posológica empleada en los tres pacientes que recibieron infliximab fue una dosis de 5 mg/kg administrados durante 2 horas, seguida de dosis adicionales a las 2 y 6 semanas siguientes a la primera, y posteriormente cada 8 semanas. La dosis empleada en los 8 pacientes que recibieron adalimumab fue 80 mg en la semana 0, seguida de 40 mg administrados en semanas alternas empezando una semana después de la dosis inicial. En el momento de iniciar el tratamiento biológico, uno de los pacientes candidato a etanercept (paciente 3) estaba en tratamiento con ultravioleta B de banda estrecha (UVB-BE) desde hacía 4 meses siendo suspendido a las 4 semanas; el paciente 13 candidato a adalimumab estaba en tratamiento con metotrexato desde hacía seis semanas; y uno de los pacientes con infliximab (paciente 16) tomaba acitretino desde hacía 2 meses, suspendiéndose a las 8 semanas (tabla 2). Todos los pacientes tuvieron un tiempo libre de biológico de un mes antes de ser reclutados en el estudio.

Los pacientes realizaron visitas periódicas cada 8 semanas, con evaluación del PASI por un único dermatólogo. Como parámetro de eficacia se utilizó el PASI-75, que indica el porcentaje de pacientes que alcanzan una mejoría superior o igual al 75% del PASI basal. De modo que los pacientes se estratificaron en respondedores y no respondedores en función de si alcanzaron el PASI-75 o no. El PASI-90 se utilizó para definir aquellos pacientes con una respuesta excelente. Todos los pacientes completaron 24 semanas de tratamiento sin interrupciones ni efectos adversos severos. Aunque no se realizaron cambios de tratamiento en este periodo sí se modificaron con posterioridad en los casos de respuesta insatisfactoria. Tras 12 meses, cinco pacientes cambiaron a otro inhibidor del TNF- $\alpha$  y/o ustekinumab; dos requirieron añadir metotrexato al anti-TNF para controlar la enfermedad, seis realizaron terapia intermitente (suspensión del tratamiento y reintroducción tras la recaída); dos mantuvieron el tratamiento de forma continua; en tres se suspendió el tratamiento controlando la enfermedad con UVB-BE y/o terapia tópica; y dos pacientes se perdieron en el seguimiento.

Como grupo control se seleccionaron pacientes del servicio de Dermatología del Complejo Asistencial Universitario de León con patología cutánea no inflamatoria, a los que se les realizó injerto cutáneo de piel total (n=2) o extirpación de alguna lesión cutánea (nevus melanocítico (n=6), dermatofibroma (n=2), carcinoma basocelular (n=2)); y pacientes intervenidos de mamoplastia (n=2) en el servicio de Cirugía Plástica de dicho hospital. Previamente se descartó que padecieran alguna enfermedad sistémica o cutánea generalizada mediante la revisión de la historia clínica y la exploración

física. Un total de 14 controles participaron en el estudio. La media de la edad fue 44,5 (rango, 25-89), y la distribución por sexos varón:mujer, 4:10.

El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de León, cumpliendo con los principios de la Declaración de Helsinki. Tanto los pacientes como los controles aceptaron y firmaron el consentimiento informado antes de iniciar el estudio.

Tabla 2. Características de los pacientes antes del tratamiento con inhibidores del TNF- $\alpha$  y tratamiento administrado.

Paciente	Edad	Sexo	PASI	Artropatía	Edad de inicio	Tratamientos sistémicos convencionales previos	Tratamientos biológicos previos	Tratamiento inicial
1	45	H	14	No	40	MTX	No	ADL
2	54	H	8,1	Sí	46	MTX	No	ETN
3	44	H	10,2	No	16	UVB-BE, PUVA, ACT, MTX	EFL, ETN	ETN
4	53	H	17	Sí	-	-	No	ADL
5	40	M	15,2	No	14	UVB-BE, PUVA, MTX	ETN	ETN
6	37	H	15,3	No	17	PUVA, ACT, MTX, CSA	No	ADL
7	35	H	11,7	No	15	UVB-BE, PUVA, ACT, CSA	No	ETN
8	29	M	7,2	Sí	18	CSA	No	ADL
9	30	H	10,8	No	20	UVB-BE	ETN	ETN
10	38	M	20	No	12	PUVA, ACT, MTX, CSA,	IFX, ETN	IFX
11	57	H	11	Sí	49	MTX	ETN	ETN
12	41	H	8,1	No	31	ACT	EFL	ETN
13	38	M	12,6	Sí	10	UVB-BE, PUVA, MTX	No	ADL
14	42	H	7,7	No	28	UVB-BE	No	ADL
15	37	H	9,1	No	6	UVB-BE, PUVA, MTX	No	ETN
16	52	H	23,3	Sí	21	UVB-BE, ACT, MTX, CSA	EFL	IFX
17	42	H	9,6	Sí	17	UVB-BE, PUVA, ACT	No	IFX + MTX
18	56	H	18,8	No	43	PUVA, ACT	No	ADL
19	17	M	11,1	No	12	UVB-BE	No	ETN
20	58	M	7,5	Sí	20	PUVA, MTX	No	ADL

Abreviaturas: UVB-BE, ultravioleta B de banda estrecha; PUVA, ultravioleta A con psoraleno; MTX, metotrexato; CSA, ciclosporina; ACT, acitretino; EFL, efalizumab; ETN, etanercept; ADL, adalimumab; IFX, infliximab.

### **3.3. Muestreo**

El estudio incluyó una visita inicial antes del tratamiento (t0), una visita de seguimiento después de 16 semanas de tratamiento (t1), y la última a los 30 meses (t2). En cada visita se valoró clínicamente al paciente, se realizaron fotografías y se tomaron muestras sanguíneas. Las biopsias cutáneas únicamente se recogieron en t0 y t1, y solo en 18 de los 20 pacientes.

#### *3.3.1. Muestras sanguíneas*

La sangre se extrajo mediante venopunción. En las extracciones t0 y t1 se recogieron: un tubo de bioquímica sin anticoagulante, dos tubos con EDTA y dos tubos con citrato sódico. En la extracción t2 únicamente se recogió un tubo de bioquímica sin anticoagulante.

A partir del tubo de bioquímica sin anticoagulante se extrajo el suero para la determinación de citoquinas, PCR, SAA y ASLO. Uno de los tubos con EDTA se utilizó para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias y otro se congeló a -80°C para estudios posteriores de ADN genómico. Los tubos de citrato se utilizaron para el estudio de linfocitos T reguladores previo aislamiento de linfocitos en sangre periférica mediante gradiente de Ficoll.

##### *3.3.1.1. Obtención de suero*

La extracción del suero se realizó a partir del tubo de bioquímica. Una vez el coágulo se retrajo, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 20 min a 4°C.

La fracción correspondiente al suero se dividió en pequeñas alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

#### 3.3.1.2. Aislamiento de linfocitos en sangre periférica

Las células mononucleares (monocitos y linfocitos) en sangre periférica fueron purificadas por gradiente de Ficoll, una técnica de centrifugación por gradiente de densidad utilizando como medio la solución Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega). La técnica se basa en la menor densidad (por debajo de 1,077 g/ml) de las células mononucleares respecto a los eritrocitos y las células polimorfonucleares.

El tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y la separación de la población mononuclear no superó las 8 h. La sangre diluida en solución tampón PBS se añadió a un tubo que contenía 4 ml de Lymphoprep, evitando mezclar la sangre con la solución. Tras una centrifugación a 1800 rpm durante 30 min a temperatura ambiente se separaron distintas fases. Se recogió la fase blanquecina correspondiente a las células mononucleares y se realizaron dos lavados con PBS para purificar las células. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS.

#### 3.3.1.3. Purificación de ADN genómico

El aislamiento del ADN genómico se realizó a partir de la sangre anticoagulada en EDTA mediante el kit High Pure PCR Template Preparation (Roche).

Inicialmente las células contenidas en 200 µl de sangre se lisaron mediante una incubación con 200 µl de solución buffer y 40 µl de proteinasa K, durante 10 min a 70°C. Posteriormente se añadió 100 µl de isopropanol, y la mezcla se filtró a través de una columna colocada en un tubo colector, en la cual los ácidos nucleicos quedaron unidos selectivamente. Los ácidos nucleicos unidos fueron purificados de componentes celulares contaminantes mediante tres lavados. Finalmente el ADN unido a la columna se liberó mediante una elución con 200 µl de buffer. Las muestras se conservaron hasta su posterior utilización a -20°C.

### 3.3.2. Muestras cutáneas

#### 3.3.2.1. Biopsia cutánea

En el momento basal (t0) a cada paciente se le realizó una biopsia de una placa de psoriasis mediante un punch de 4 mm. En el tiempo t1 la muestra se obtuvo de la misma placa de psoriasis, habitualmente resuelta. La cantidad de tejido recogida en los controles fue similar a la de los pacientes. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -196°C hasta su posterior procesamiento.

#### 3.3.2.2. Pulverización

La piel, por su alto contenido en queratina y colágeno, no puede ser sometida directamente al proceso de homogeneización, precisando previamente una fase de pulverización, para lo cual empleamos el pulverizador de mano, Biopulverizer (BioSpec). Debido al alto contenido en agua, el tejido cutáneo a la

temperatura del nitrógeno líquido se convierte en un material frágil. El pulverizador es capaz de reducir el tejido congelado en nitrógeno líquido a fino polvo.

Cada muestra cutánea, congelada en nitrógeno líquido, se colocó en el interior del pulverizador, previamente enfriado en nitrógeno líquido. El resultado fue la fragmentación de la muestra en pequeños pedazos. Entre la base y el cilindro del pulverizador se colocó una fina película de plástico desechable para facilitar la recogida de la muestra, mantener el pulverizador limpio y evitar que se produjesen contaminaciones entre una muestra y otra.

#### *3.3.2.3. Disrupción y homogeneización*

La disrupción y homogeneización adecuada del material es un paso previo necesario para la purificación del ARN. La disrupción de las membranas plasmáticas de las células y organelas es requerida para la liberación de todo el ARN contenido en la muestra. La homogeneización reduce la viscosidad del lisado, rompe el ADN genómico de alto peso molecular y otros componentes celulares de elevado peso molecular para crear un lisado homogéneo. La disrupción y homogeneización incompletas reducirían la cantidad de ARN purificado.

El material obtenido de la pulverización se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis, y fue sometido a la acción del homogeneizador Tissue-Tearor (BioSpec) durante 30 s, lo que permitió la lisis y homogeneización del tejido mediante acción mecánica de alta frecuencia.

#### *3.3.2.4. Purificación del ARN*

El ARN total fue aislado mediante el kit Rneasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Ambion, Inc, Austin, Texas, USA). El kit permite procesar un máximo de 100 mg de tejido cutáneo por columna sin exceder la capacidad de purificación de ARN del kit. La capacidad de unión máxima de ARN son 100 µg. El kit purifica moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos, por lo que provee un enriquecimiento relativo en ARNm debido a que los ARN menores de 200 nucleótidos, como el ARN ribosomal (ARNr) 5.8S, ARNr 5S y los ARN transportadores (ARNt), que juntos son el 15-20% del ARN, son excluidos.

El kit se basa en una solución de lisis de fenol/tiocianato de guanidina y una membrana de sílice para la purificación del ARN. El tampón de lisis en el que se homogeneizó la muestra fue una solución de fenol y tiocianato de guanidina, diseñado para facilitar la lisis en este tipo de tejidos e inhibir las ribonucleasas. El fenol se utilizó en combinación con cloroformo, para aumentar la eficiencia de la extracción, ya que su alta densidad y su capacidad para disolver lípidos y proteínas proporcionan fases acuosas menos contaminadas. Tras añadir el cloroformo y una centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4°C, el homogeneizado se separó en tres fases con distinta solubilidad: una fase superior e incolora, la fase acuosa que contenía el ARN; una interfase blanca, que contenía el ADN y proteínas; y una inferior, roja, la fase orgánica (fenólica), que contenía proteínas y lípidos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadió etanol para proveer de unas condiciones de unión apropiadas. La muestra se colocó sobre una de las columnas a cuya membrana quedó unido

el ARN tras una centrifugación a 8000 x g durante 15 s a temperatura ambiente. El fenol y otros contaminantes fueron eliminados mediante varios lavados con soluciones tamponadas administradas en el equipo. Finalmente, el ARN fue eluído en agua libre de ribonucleasas.

#### *3.3.2.5. Medición de la concentración y pureza del ARN*

Para establecer la concentración y la calidad del ARN se midió la absorbancia a 260 ( $A_{260}$ ) y 280 ( $A_{280}$ ) nm utilizando un espectrofotómetro. La concentración del ARN obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). La pureza o calidad de la muestra respecto a los contaminantes que absorben en el espectro de la luz ultravioleta, tal como las proteínas, se estimó mediante el cociente  $A_{260} / A_{280}$ , considerando que una solución pura de ARN tiene una relación  $A_{260} / A_{280}$  de  $2 \pm 0,05$ .

#### *3.3.2.6. Eliminación de ADN genómico residual*

Aunque el kit Rneasy Lipid Tissue Mini Kit elimina la mayor parte del ADN genómico, pueden permanecer pequeñas trazas que pueden interferir en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Para eliminar cualquier resto de ADN genómico contaminante, 1µg de cada muestra de ARN se trató con rDNase, I Rnase-Free (USB, Cleveland, Ohio, USA) durante 15 min a 25°C. La enzima rDNase es una endonucleasa que hidroliza las uniones fosfodiéster en el ADN.

### *3.3.2.7. Síntesis de ADN complementario*

A partir del ARN se sintetizó el ADN complementario (ADNc) por medio de una transcriptasa reversa, para lo cual utilizamos el kit iScript cDNA synthesis (BioRad Laboratories, USA). La enzima empleada fue una transcriptasa reversa derivada del Moloney Murine Leucemia Virus (MMLV) modificada. La enzima está combinada con inhibidores de ribonucleasas para evitar la acción de ribonucleasas contaminantes. Los cebadores utilizados para la transcripción inversa fueron hexanucleótidos con secuencias al azar (random primers) y oligo(dT), estos últimos son cebadores formados por oligonucleótidos sintéticos de polideoxitimidina que se unen a las colas poli(A) de los ARNm. La enzima utiliza como molde las moléculas de ARN a las que se han unido los cebadores sintetizando en sentido 3'-5'. El protocolo de incubación en el termociclador fue: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C y un ciclo final a 4°C durante un tiempo indefinido. Para estabilizar el ADNc se añadió T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> y se guardaron por cada muestra 6 alícuotas de 10 µl a -80°C hasta su posterior uso como sustrato para la RCP a tiempo real (RCP-TR).

## **3.4. Métodos**

### *3.4.1. Determinación del ASLO*

Se realizó por Nefelometría utilizando un Nefelómetro BN II de Behring (Siemens, Alemania).

### 3.4.2. Tipaje HLA

La técnica utilizada para genotipar el HLA fue la RCP con cebadores específicos de secuencia. Para el tipaje genérico del locus HLA-C, se utilizó el kit Micro SSP™ HLA Class I C Locus Specific (SSP1C) (OneLambda Inc., USA) y en el caso de los pacientes HLA-C\*06 se les realizó el tipaje alelo específico con el kit Micro SSP™ Allele Specific HLA Class I (C\*06) (SSP1 C06) (OneLambda Inc., USA).

Para el kit Micro SSP™ HLA Class I C Locus Specific (SSP1C) los volúmenes utilizados por prueba fueron: 270 µl de D-Mix, 29 µl de ADN, 1,5 µl de Taq polimerasa; y para el kit Micro SSP™ Allele Specific HLA Class I (C\*06) (SSP1 C06): 180 µl de D-Mix, 19 µl de ADN y 1 µl de Taq polimerasa. Se añadió una alícuota de 10 µl de la muestra-mezcla de reacción en cada pocillo de la placa y se realizó la RCP siguiendo el siguiente programa:

Nº de ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	1	93	300
	2	96	120
12	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fin	1	4	---

Después de completar la RCP, se transfirió cada reacción de RCP, por orden, a un gel de agarosa al 2,5%. Para separar los fragmentos amplificados se realizó la electroforesis de las muestras a 140-150 V durante 3-5 min y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

La interpretación de los resultados se basó en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN amplificado. Para verificar la integridad de la reacción de la RCP se utilizó un control interno, de modo que se incluyeron un par de cebadores en cada reacción de RCP que amplifica una región conservada del gen de la  $\beta$ -globina humana, presente en todas las muestras de ADN.

#### *3.4.3. Determinación de la proteína C reactiva y sustancia amiloide A*

Como marcadores de inflamación sistémicos convencionales se determinaron la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR) mediante inmunoturbidimetría (Roche), siendo el límite de detección 0,15 mg/l; y la sustancia amiloide A (SAA) mediante nefelometría (BNII, Behring, Siemens, Alemania), siendo el valor límite de detección 0,28 mg/l. Para el análisis estadístico, los valores por debajo de los niveles de detección se consideraron como 0,1 mg/l.

#### *3.4.4. Análisis de citoquinas en suero*

##### *3.4.4.1. Análisis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 y VEGF*

Los niveles séricos de dichas citoquinas fueron cuantificados mediante la técnica Cytometric Bead Array (CBA), utilizando los equipos comerciales Human Inflammatory Cytokines y Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU), y reactivos CBA específicos para el análisis de VEGF. La adquisición de los datos se realizó en un citómetro de flujo de doble láser FACSCanto (Becton Dickinson, EEUU).

La técnica es una aplicación de la citometría de flujo que permite la cuantificación de varias proteínas de forma simultánea, mediante la detección por fluorescencia de grupos diferentes de partículas recubiertas por anticuerpos específicos para las proteínas a estudio. La interpolación de las concentraciones de las muestras problemas con una curva estándar determina la concentración de la proteína a estudio.

La combinación de las diferentes poblaciones de partículas de cada kit (se mezclaron 10  $\mu$ l de cada población de partículas y se transfirieron 50  $\mu$ l de la mezcla a cada tubo) se incubaron con 50  $\mu$ l del suero problema o de las diluciones de los estándares y con 50  $\mu$ l de una mezcla de anticuerpos conjugados con ficoeritrina (FE) dirigidos contra las proteínas a estudio, formándose un complejo en forma de sándwich (partículas de captura, proteína a estudio, anticuerpos de detección). Tras 3 h de incubación a temperatura ambiente con protección de la luz y lavado, se resuspendieron los pellets en 300  $\mu$ l de buffer y las muestras se adquirieron, previa calibración, en el citómetro de flujo.

Para la obtención de la curva estándar se reconstituyeron los liofilizados de los estándares con 2 ml de diluyente. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256, de modo que se obtuvieron 10 puntos para formar la curva estándar. El rango de concentraciones cubierto fue entre 0 y 5000 pg/ml.

El análisis de los datos se realizó mediante el software FCAP Array (Becton Dickinson, EEUU). Los resultados se expresaron en pg/ml. Los límites de detección (pg/ml) para cada proteína fueron: 7,2 para IL-1 $\beta$ ; 2,4 para IL-6; 2,2

para IL-8; 3,8 para TNF- $\alpha$ ; 1,9 para IL-12p70; 3,7 para IFN- $\gamma$ ; 4,9 para IL-4; 18,9 para IL-17; 3,3 para IL-10 y 5 para VEGF. Para el análisis estadístico, los valores por debajo de los límites de detección se consideraron como 1pg/ml.

Para reducir al mínimo las variaciones intra e interexperimento, se analizó una alícuota de cada paciente o control por duplicado en el mismo ensayo, y se repitió en un ensayo diferente con la alícuota restante.

#### *3.4.4.2. Análisis de IL-22*

Los niveles de IL-22 en suero fueron determinados utilizando el kit Quantikine Human IL-22 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Se trata de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich.

En esta técnica se utilizan dos anticuerpos distintos que reaccionan con epítopos diferentes del antígeno que se desea medir. Una cantidad fija del primer anticuerpo está unida a una serie de pocillos sólidos iguales. Se añadieron 100  $\mu$ l de las soluciones problema que contenían antígeno en una concentración desconocida o una serie de soluciones estándar de concentraciones conocidas y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente para que los antígenos se unieran al anticuerpo. El antígeno no unido se eliminó mediante varios lavados. Se añadieron 200  $\mu$ l del segundo anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa, y se incubó durante otras 2 h a temperatura ambiente, seguido de varios lavados. El complejo formado por el anticuerpo monoclonal específico para la proteína a estudio unido a los micropocillos, la proteína y el anticuerpo monoclonal específico unido a la enzima peroxidasa se detectó añadiendo una solución de tetrametilbenzidina y

peróxido de hidrógeno como sustrato cromógeno. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro a 450 nm con la corrección de longitud de onda colocada a 540 nm o 570 nm. La dosis mínima detectable de IL-22 fue 2,7 pg/ml. Para el análisis estadístico, los valores por debajo de los límites de detección se consideraron como 1pg/ml.

Al igual que en el apartado anterior, se analizó una alícuota de cada paciente o control por duplicado en el mismo ensayo, y se repitió en un ensayo diferente con la alícuota restante.

#### *3.4.5. Cuantificación mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real*

Los estudios de expresión génica diferencial en tejido cutáneo se realizaron mediante RCP-TR.

La RCP es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es la amplificación enzimática de un fragmento de ADN, es decir, obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.

La RCP-TR combina la técnica de la RCP convencional con el uso de fluorescencia para detectar el producto amplificado en la misma reacción, permitiendo que los procesos de amplificación y detección se produzcan de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior, reduciendo el tiempo experimental y la posibilidad de contaminación. De modo que mediante la detección por fluorescencia durante la amplificación se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad

de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

El ciclo umbral ( $C_t$ ) se define como el número de ciclo en el cual la cantidad acumulada de producto amplificado es suficiente para emitir señal fluorescente. Viene determinado fundamentalmente por la cantidad de muestra presente al inicio de la reacción de amplificación. De esta manera, cuando la cantidad de muestra es grande, se requerirán pocos ciclos de amplificación para emitir señal fluorescente, y por lo tanto, la reacción tendrá un  $C_t$  bajo o temprano. En contraste, si la cantidad de muestra es pequeña al inicio de la reacción, el  $C_t$  será alto o tardío.

Se diseñó un ensayo de tipo singleplex. Para monitorizar la amplificación de la secuencia diana utilizamos el SYBR Green I (Molecular Probes, Invitrogen), un fluorocromo que se une de forma no específica al ADN de doble cadena. Cuando está libre en solución emite poca fluorescencia, pero es capaz de aumentar la fluorescencia hasta 1000 veces cuando se intercala en el ADN de doble cadena. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es fácil y además, es más barato que las sondas específicas, el otro sistema de detección por fluorescencia empleado en la RCP-TR. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. La RCP-TR fue llevada a cabo utilizando un termociclador iCycler con módulo óptico (BioRad Laboratories, USA). Cada amplificación se desarrolló en un volumen final de 20  $\mu$ l, conteniendo: 50 ng de ADNc, 0,2 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),

0,5 U de Taq ADN polimerasa (Hotmaster), 2  $\mu$ M de cebadores, SYBR Green (1:10000), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Biotools) y buffer 1x. El diseño de los cebadores se realizó mediante el programa Primer3, accesible de forma gratuita en internet, (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>). La síntesis fue llevada a cabo por Isogen Bioscience BV. Las secuencias de los cebadores específicos utilizados se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Cebadores empleados en la RCP-TR.

Gen	Cebador directo	Cebador reverso	Tamaño amplificado
TNF- $\alpha$	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA	CCTCTGATGGCACCACCAG	151
IL-1 $\beta$	GGACAGAATATCAACCAACAAGTGATA	GTGTGCCGTCTTTCATTACACAG	151
IL-6	CAAGTCGGTGGCTTAATTATTACACATG	ATTGCCATTGCACAACCTCTTTTCT	151
VEGF	ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG	CTCACCAAGGCCAGCACATAGG	91
IFN- $\gamma$	GGCTGTACTGCCAGGACCCATATGT	GATGCTCTTGACCTCGAAACAGCAT	440
IL-17A	TCACCTTGAATCTCCACCG	GGACCAGGATCTCTTGCTGG	151
IL-22	TTCCAGCAGCCCTATATCACC	GCTCACTCATACTGACTCCGTG	124
EF1 $\alpha$	TGTTCTGTTGGCCGAGTG	ATTGAAGCCCACATTGTCCC	100

Cada muestra fue amplificada por triplicado. Las condiciones de amplificación utilizadas para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF, IFN- $\gamma$ , e IL-17A se muestran a continuación:

- Desnaturalización: 95°C durante 5 min.
- Amplificación y cuantificación: desnaturalización a 95° durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s, extensión a 65°C durante 30 s, medida de fluorescencia a 82°C durante 10 s. Repetición durante 30 ciclos.
- Ciclo final de enfriamiento a 4°C durante un tiempo indefinido.

Para IL-22 las condiciones empleadas fueron:

95°C 10 min

95°C 5 s  
56°C 10 s     x 45 ciclos  
72°C 10 s

95°C 0 s  
65°C 15 s     x 1 ciclo  
95°C 0 s

40°C 10 sg

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software del iCycler (BioRad, Laboratories). El método de cuantificación utilizado para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF, IFN- $\gamma$ , e IL-17A se basó en la cuantificación relativa de un gen problema utilizando como normalizador los niveles de expresión de un gen de referencia. Se utilizó como gen normalizador el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ). En estudios preliminares de amplificación en 100 ng de ARN retrotranscrito los  $C_t$  para el gen EF1 $\alpha$  fueron similares en los tres tipos de muestras de nuestro estudio, reflejando que el nivel de expresión es constante en todas las muestras, y que su expresión no se modifica con los tratamientos empleados en nuestro estudio. El método matemático empleado para el análisis de datos fue el método Pfaffl, debido a que las eficiencias de los genes diana y normalizador no fueron similares. Según este modelo la expresión relativa del gen problema se calcula como:

$$Expresión \cdot relativa = \frac{(E_{problema})^{\Delta Ct, problema(calibrador-muestra)}}{(E_{referencia})^{\Delta Ct, referencia(calibrador-muestra)}}$$

E problema = Eficiencia del gen problema.

E referencia = Eficiencia del gen de referencia

$\Delta Ct$ , problema (calibrador – muestra) = Ct del gen problema en el calibrador menos Ct del gen problema en la muestra.

$\Delta Ct$ , referencia (calibrador – muestra) = Ct del gen referencia en el calibrador menos Ct del gen referencia en la muestra.

Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/ml (UA/ml).

El método de análisis empleado para IL-22 fue mediante cuantificación absoluta. Calculamos el resultado de cada muestra, extrapolándolo a una curva estándar de concentraciones conocidas usada intraensayo. El estándar se obtuvo a partir de linfocitos aislados de sangre completa de controles sanos tras estimulación *in vitro* con mitógenos de linfocitos T. Posteriormente se realizó la extracción de ARN total, el paso a ADNc, la amplificación específica (RCP) del fragmento deseado (IL-22) con los mismos cebadores, electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de RCP, recuperación de la banda del gel y purificación de la misma, cuantificación del estándar y realización de diluciones para poder realizar la curva que usamos en la RCP cuantitativa. En este caso, el resultado se expresó en concentración (ng/ml).

#### *3.4.6. Determinación de las subpoblaciones linfocitarias*

Las poblaciones linfocitarias T, B y NK fueron estudiadas mediante citometría de flujo el día de su obtención, a partir de una muestra de sangre anticoagulada con EDTA, utilizando un citómetro FACSCanto (Becton-Dickinson, USA).

Se marcaron 100µl de sangre con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos frente a CD45, CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19, CD14 (Becton-Dickinson) durante 30 min a 4°C en oscuridad, utilizando tubos Trucount, que permiten realizar un conteo de linfocitos en valores absolutos. Los hematíes fueron posteriormente lisados con la solución FACS lysis durante 10 min. El pellet de linfocitos tras centrifugación a 1200 rpm durante 5 min fue lavado y resuspendido en 250 µl de PBS para su adquisición en el citómetro. Los datos fueron analizados con el software FACSDiva y se presentan como número absoluto (células/µl).

#### *3.4.7. Población de linfocitos T reguladores*

En la actualidad los marcadores más frecuentemente utilizados para la identificación, aislamiento y caracterización de los Treg son CD4, CD25, CD127 y FoxP3. El método utilizado en este ensayo para la caracterización de los Treg se basa en la identificación de los linfocitos T CD4, que expresan niveles más elevados de CD25, y de ellos, los que expresan el factor de transcripción FoxP3 y no expresan CD127.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo para la tinción de la superficie celular de las células mononucleares de sangre periférica: CD3 (clon SK7) y CD25 (clon 2A3) de Becton-Dickinson, y CD4 (clon RPA-T4) y CD127 (clon M21) de Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, EEUU). Para la tinción intracelular del factor de transcripción FoxP3, las células se fijaron y se permeabilizaron mediante el Kit Human FoxP3 Buffer Set (Becton Dickinson, Pharmingen, San Diego, CA, EEUU). El anticuerpo utilizado fue Foxp3 (clon 259D/C7, Pharmingen). Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo de doble láser, FACSCanto (Becton Dickinson) y analizadas mediante el software FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregón, EEUU). El número de linfocitos CD3+CD4+ analizados de cada muestra fue de al menos 30000. Se definieron las siguientes poblaciones: linfocitos CD3 CD4 totales (CD3+ CD4+), linfocitos T CD25 totales (CD3+ CD4+ CD25+), linfocitos T con coexpresión de CD25 y Foxp3 (CD3+ CD4+ CD25+ Foxp3+), y Treg (CD3+ CD4+ CD25<sup>alto</sup> Foxp3+ CD127-). Los porcentajes se refirieron al total de linfocitos CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>.

### **3.5. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v17.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EEUU) y para la obtención de gráficos el programa GraphPad Prism 6. Las variables continuas se expresan como mediana (rango). Se han empleado test no paramétricos debido al pequeño tamaño muestral y a que la mayoría de los datos analizados no siguen la distribución

normal. Los contrastes entre variables cualitativas se analizaron mediante el test exacto de Fisher. El test U-Mann-Whitney se empleó para evaluar las diferencias de las variables cuantitativas entre grupos no relacionados. Para la comparación de dos muestras apareadas se utilizó la prueba de Wilcoxon; y para comparar más de dos medidas repetidas se empleó el test de Friedman. Las correlaciones entre variables continuas fueron valoradas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. La interpretación de sus valores por intervalos se expresa en la tabla 4. Se definió la significación estadística como  $p < 0,05$ .

Tabla 4. Interpretación de los valores de los coeficientes de correlación según el rango de valores.

Coeficiente	Interpretación
<b>0</b>	Relación nula
<b>0 - 0,19</b>	Relación muy baja
<b>0,2 - 0,39</b>	Relación baja
<b>0,4 - 0,59</b>	Relación moderada
<b>0,6 - 0,79</b>	Relación alta
<b>0,8 - 0,99</b>	Relación muy alta
<b>1</b>	Relación perfecta

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Respuesta clínica

Se observó respuesta clínica en todos los pacientes, alcanzándose el PASI-75 en 15 de los 20 pacientes (75%) a las 16 semanas de tratamiento. En ese momento, el 50% de los pacientes alcanzó el PASI-90. Únicamente dos pacientes (10%), aunque mejoraron clínicamente, no alcanzaron el PASI-50 (tabla 5).

Tabla 5. Eficacia del tratamiento inicial y tratamientos administrados en el seguimiento a largo plazo.

Paciente	Tratamiento inicial	PASI t0	PASI t1	Mejoría del PASI en la semana 16 (%)	PASI-50	PASI-75	PASI-90	Tratamiento posterior
1	ADL	14	0	100	Sí	Sí	Sí	ND
2	ETN	8,1	3	63	Sí	No	No	+ MTX
3	ETN	10,2	2	80,4	Sí	Sí	No	ETN (I)
4	ADL	17	0	100	Sí	Sí	Sí	UVB-BE
5	ETN	15,2	2	86,84	Sí	Sí	No	ADL
6	ADL	15,3	0	100	Sí	Sí	Sí	ADL (I)
7	ETN	11,7	5,6	52,10	Sí	No	No	ETN (I)
8	ADL	7,2	0	100	Sí	Sí	Sí	ADL (C)
9	ETN	10,8	0,8	92	Sí	Sí	Sí	ETN (I)
10	IFX	20	3,8	81	Sí	Sí	No	ADL, UST
11	ETN	11	0	100	Sí	Sí	Sí	ADL, UST
12	ETN	8,1	0	100	Sí	Sí	Sí	Tópico
13	ADL	12,6	0	100	Sí	Sí	Sí	UVB-BE
14	ADL	7,7	3,6	53,20	Sí	No	No	IFX + MTX, UST
15	ETN	9,1	4,8	47,20	No	No	No	ETN (C)
16	IFX	23,3	0	100	Sí	Sí	Sí	IFX (I)
17	IFX + MTX	9,6	0	100	Sí	Sí	Sí	ND
18	ADL	18,8	3,6	81	Sí	Sí	No	+ UVB-BE, UST
19	ETN	11,1	1,2	89	Sí	Sí	No	ETN (I)
20	ADL	7,5	5	33,33	No	No	No	+ MTX

Abreviaturas: UVB-BE, ultravioleta B de banda estrecha; MTX, metotrexato; ETN, etanercept; ADL, adalimumab; IFX, infliximab, UST, ustekinumab; C, tratamiento continuo; I, tratamiento intermitente; ND, no disponible

Aunque no se observó diferencia estadísticamente significativa en la mejoría del PASI entre los dos grupos de tratamiento, proteína de fusión versus anticuerpos monoclonales ( $p=0,230$ ), sí se objetivó una tendencia a obtener mejores resultados clínicos en el grupo de los anticuerpos monoclonales (fig. 8 y 9). El porcentaje medio de mejoría del PASI a la semana 16 fue 78,9% (rango = 47,20 - 100%) para el grupo tratado con etanercept, mientras que el grupo de los anticuerpos monoclonales disminuyó el PASI una media de 86,2% (rango = 33,33 - 100%) (fig. 8). No se observaron diferencias entre los dos grupos en cuanto a la gravedad clínica inicial de la psoriasis ( $p=0,295$ ) (fig. 9). El 67% de los pacientes tratados con etanercept obtuvo la respuesta PASI-75 tras la fase de inducción, frente al 82% de los pacientes tratados con anticuerpos monoclonales. La mejoría clínica en uno de los pacientes se ilustra en la fig. 10.

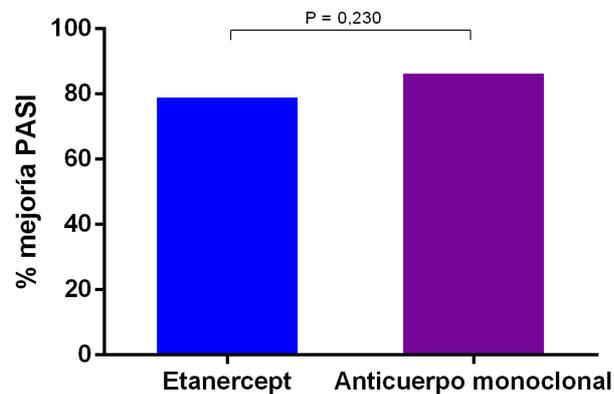


Figura 8. Mejoría del PASI en cada grupo de tratamiento a las 16 semanas.

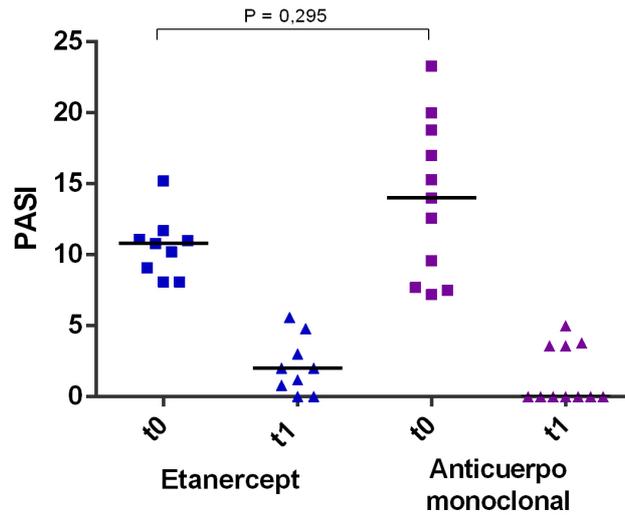


Figura 9. Respuesta clínica a las 16 semanas de tratamiento en el grupo de pacientes tratados con etanercept frente al grupo de pacientes tratados con infliximab o adalimumab.



Figura 10. Paciente con psoriasis en placa severa, antes (A) y tras 16 semanas de tratamiento con infliximab (B).

#### *4.1.1. Respuesta clínica y HLA*

El 50% de los pacientes psoriásicos de nuestra serie, en comparación con el 14% de los controles, eran portadores del alelo HLA-Cw6\*0602. La edad media de aparición de la psoriasis en los pacientes portadores del alelo fue 24,1 años, frente al 19,4 de los no portadores. De los 10 pacientes portadores, 6 tenían antecedentes familiares de psoriasis, frente a 5 en el grupo de los no portadores.

No se observaron diferencias en la respuesta al tratamiento en función de la presencia del HLA-Cw6. (PASI-75,  $p=0,303$ ; PASI-90,  $p=0,656$ ). Tampoco se observó relación entre el HLA-Cw6 y la variable artropatía ( $p=1,000$ ).

#### *4.1.2. Respuesta clínica y niveles de ASLO*

No se observaron diferencias en los niveles de ASLO entre pacientes y controles ( $p=0,592$ ), ni modificación tras el tratamiento ( $p=0,372$ ). Solo 5 de los 20 pacientes (25%) mostraron niveles de ASLO por encima de 200 U/ml antes del tratamiento, manteniendo los niveles elevados a las 16 semanas.

Únicamente 2 de los 5 pacientes con títulos de ASLO elevados eran HLA-Cw6 positivos. En el análisis estadístico no se observaron diferencias en los niveles de ASLO en función de la presencia o no del alelo HLA-Cw6 ( $p=0,796$ ).

La presencia de niveles de ASLO elevados no condicionó la respuesta clínica (PASI-75,  $p=0,560$ ; PASI-90,  $p=1,000$ ), ni la presencia de artropatía ( $p=0,603$ ).

## 4.2. Estudio de biomarcadores de inflamación en suero

### 4.2.1. Marcadores sistémicos clásicos de inflamación

Los niveles de los dos marcadores clásicos de inflamación sistémica medidos en sangre periférica, PCR y SAA, no mostraron diferencias significativas en pacientes respecto a controles sanos ( $p=0,204$  y  $0,096$ , respectivamente) (fig. 11). Pese a no observarse diferencias en el análisis estadístico, en el grupo de pacientes, a nivel individual, 13 de los 20 pacientes tenían niveles más elevados de PCR respecto a la mediana de los controles, esta elevación fue más frecuente para la SAA, donde 16 de los 20 pacientes mostraron cifras más altas que los controles (tabla 6).

Después del tratamiento, las concentraciones de ambas proteínas disminuyeron, alcanzando significación estadística únicamente para PCR ( $p=0,031$ ) (fig. 11). En 14/20 y 15/20 de los pacientes se observó una disminución de PCR y SAA, respectivamente, después del tratamiento (tabla 6).

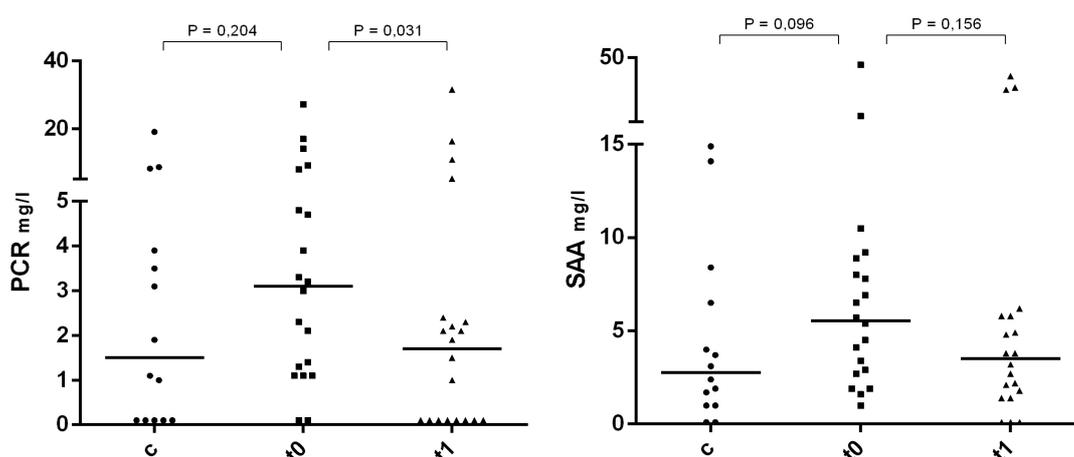


Figura 11. Niveles de PCR y SAA en suero de controles y pacientes, antes del inicio del tratamiento y a las 16 semanas.

Tabla 6. Expresión de PCR y SAA en suero, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles tras 16 semanas de tratamiento respecto a su estado basal (t0-t1).

Pacientes	PCR		SAA	
	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1
1	↑	↓	↑	↓
2	↓	↓	↓	↓
3	↓	↓	↑	↓
4	↑	↓	↓	↓
5	↑	↑	↑	↑
6	↓	=	↓	↓
7	↑	↓	↑	↓
8	↓	↓	↑	↓
9	↑	↓	↑	↓
10	↑	↓	↑	↑
11	↑	↓	↑	↓
12	↓	↓	↑	↓
13	↓	↑	↓	↑
14	↑	↓	↑	↓
15	↑	↓	↑	↓
16	↑	↓	↑	↓
17	↑	↑	↑	↑
18	↑	↓	↑	↓
19	↓	=	↑	↑
20	↑	↑	↑	↓

No observamos diferencias en el comportamiento de PCR y SAA en ninguno de los análisis estratificados según el tipo de tratamiento, la presencia o no de artropatía, HLA-Cw6, PASI-75 y PASI-90.

Tanto la PCR como la SAA mostraron correlación significativa y positiva con el PASI, aunque el grado de asociación fue bajo (PCR:  $r=0,388$ ,  $p=0,003$ ; SAA:  $r=0,298$ ,  $p=0,023$ ). Sin embargo, ambos marcadores de inflamación sistémica mostraron una correlación alta entre sí ( $r=0,621$ ,  $p=0,000$ ).

#### *4.2.2. Niveles de citoquinas en suero*

Los niveles de citoquinas proinflamatorias que podrían participar en la patogenia de la enfermedad, en base a publicaciones previas, fueron evaluados en controles sanos y en pacientes, antes y después del tratamiento (tabla 7).

Como marcadores de inflamación evaluamos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y VEGF. IL-1 $\beta$  no fue detectable en ninguna de las muestras de pacientes ni en controles.

No encontramos diferencias basales (t0) en los valores de TNF- $\alpha$  entre pacientes y controles (p=0,341), pero sí diferencias significativas tras el tratamiento (t1) (p=0,009) (fig. 12). Basalmente, solo 6 de los 20 pacientes presentaban niveles de TNF- $\alpha$  más altos que la mediana de los controles. Y paradójicamente, tras las 16 semanas de tratamiento aumentó en 9 pacientes, todos ellos tratados con etanercept (tabla 7). No se observó correlación entre TNF- $\alpha$  y PASI (r=-0,249, p=0,060).

Tabla 7. Resumen de algunas de las citoquinas estudiadas en suero, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles tras el tratamiento (16 semanas) respecto a su estado basal (t0-t1). Se muestran solo aquellas en las que hubo hallazgos relevantes.

Pacientes	TNF- $\alpha$		IL-6		IL-8		VEGF		IFN- $\gamma$		IL-12		IL-22	
	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1
1	=	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
2	=	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↑	=	=	=	=	=	=
3	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
4	=	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
5	=	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	=	=	↑	↓	↑	↓
6	=	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	↑	=	=	↑	↓
7	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	=	=	=	↑	↑	↓
8	=	=	=	=	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
9	↑	↑	=	=	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
10	=	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
11	=	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
12	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
13	=	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	↑	↓
14	=	=	↑	↓	↑	↑	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
15	=	↑	=	=	↑	↓	↑	↑	↑	↓	=	=	=	=
16	=	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	=	=	↑	↓
17	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↓	=	↑	=	↑	↑	↓
18	=	=	↑	↓	↑	↓	↓	↓	=	=	=	=	↑	↓
19	↑	↑	=	↑	↓	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	=
20	=	=	↑	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	↑	↓	↑	↓



aumentada la SAA. Solo lo observamos en 12 de los 16 pacientes de nuestra serie.

De los marcadores de inflamación, únicamente IL-6 y VEGF se correlacionaron con el PASI ( $r=0,437$ ,  $p=0,001$ ;  $r=0,516$ ;  $p=0,000$ ; respectivamente).

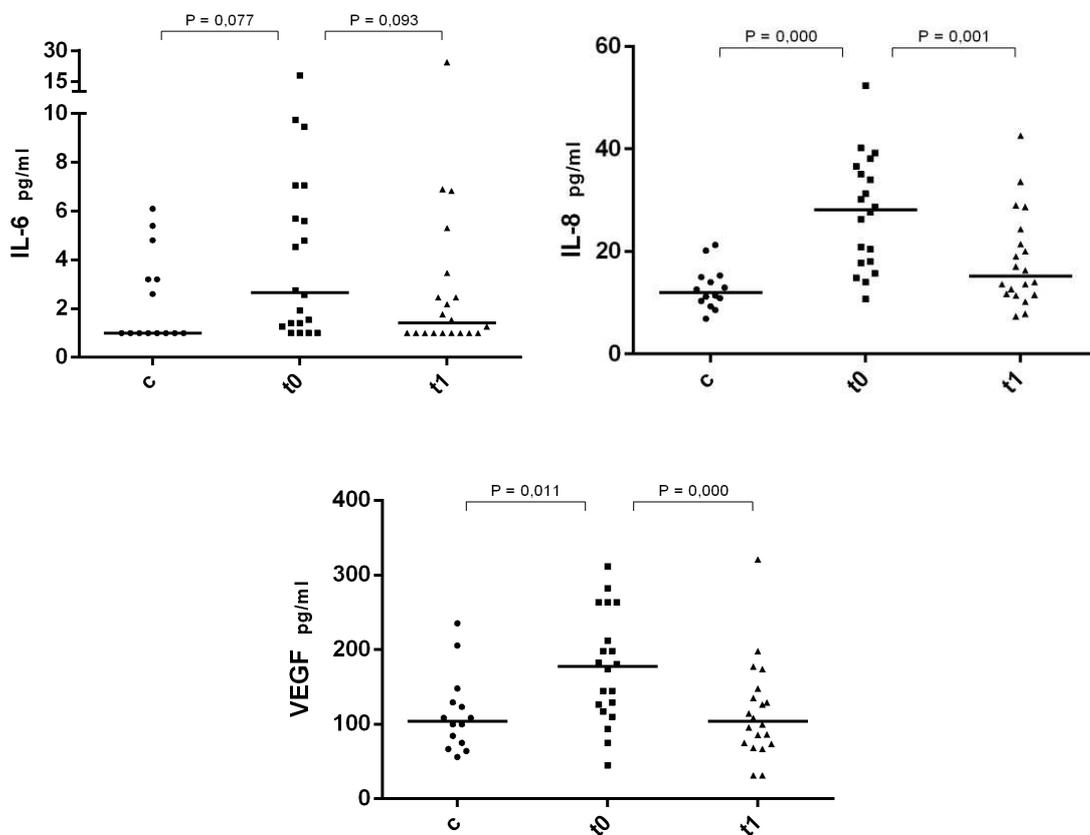


Figura 13. Niveles en suero de IL-6, IL-8 y VEGF en controles y pacientes con psoriasis, antes y a las 16 semanas de iniciar tratamiento con un inhibidor del TNF- $\alpha$ .

A continuación, valoramos un grupo de citoquinas directamente relacionadas con la respuesta inmune adaptativa, IFN- $\gamma$ , la principal citoquina secretada por

linfocitos Th1, e IL-12, principal inductora de esta respuesta. Solo 2 de los 20 pacientes tenían niveles detectables de IFN- $\gamma$  e IL-12, a diferencia de los controles donde no se detectaron en ninguno (tabla 7).

IL-4, una de las citoquinas mayoritariamente producida en las respuestas mediadas por linfocitos Th2, no mostró valores detectables en pacientes ni controles.

IL-17, como marcador de la respuesta Th17, tampoco fue detectada basalmente en ningún suero de pacientes ni de controles. Sin embargo, IL-22, citoquina secretada principalmente por los linfocitos Th17 y Th22, sí estaba aumentada de forma significativa en suero de los pacientes antes de iniciar el tratamiento en comparación con el grupo control ( $p=0,000$ ) (fig. 14). Tras 16 semanas de tratamiento (t1) observamos una disminución significativa de sus niveles séricos ( $p=0,000$ ), si bien, sin alcanzarse los niveles de controles ( $p=0,006$ ) (fig. 14). En el análisis individual de pacientes, 17 de los 20 presentaron niveles más altos que la mediana de los controles, y todos ellos disminuyeron los niveles tras el tratamiento (tabla 7). Los niveles séricos de IL-22 se correlacionaron de forma positiva y moderada con el PASI ( $r=0,556$ ,  $p=0,000$ ).

Como interleuquina reguladora se midió IL-10, siendo detectable solo en uno de los pacientes y en ninguno de los controles.



#### 4.2.4. Análisis longitudinal de seguimiento a 30 meses en pacientes sin cambio de biológico

En el seguimiento a largo plazo (30 meses), se incluyeron solamente los dos pacientes que realizaron tratamiento continuo y 4 pacientes que en ese momento estaban en tratamiento con el mismo fármaco inicial pero de forma intermitente. Los 6 pacientes mantenían una buena respuesta clínica similar a la alcanzada en t1 (tabla 8).

Tabla 8. Pacientes que mantienen el tratamiento inicial a los 30 meses de seguimiento, de forma continua o intermitente.

Paciente	Tratamiento	PASI t0	PASI t1	PASI t2
3	ETN (I)	10,2	2	0
7	ETN (I)	11,7	5,6	6
8	ADL (C)	7,2	0	0
9	ETN (I)	10,8	0,8	0
15	ETN (C)	9,1	4,8	1,6
16	IFX (I)	23,3	0	0

Abreviaturas: ETN, etanercept; ADL, adalimumab; IFX, infliximab; I, intermitente; C, continuo.

El análisis mediante el test de Friedman para comparar las muestras de los pacientes antes del tratamiento, a la semana 16 y a los 30 meses, mostró que los valores de PCR ( $p=0,030$ ), SAA ( $p=0,030$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0,039$ ) e IL-8 ( $p=0,042$ ) variaron de forma significativa a lo largo del tiempo en respuesta al tratamiento con inhibidores del TNF- $\alpha$  (fig. 15). Observando las medianas obtenidas en cada uno de los tres momentos, se observó una reducción entre el momento previo al tratamiento con anti-TNF y los momentos posteriores para PCR, SAA e IL-8 (fig. 15). Por el contrario, en el caso de TNF- $\alpha$ , se observó un aumento tras el tratamiento. No se observó significación estadística para IL-6

( $p=0,526$ ), VEGF ( $p=0,311$ ), e IL-22 ( $p=0,076$ ), pero sí una tendencia a disminuir los niveles tras el tratamiento para VEGF e IL-22.

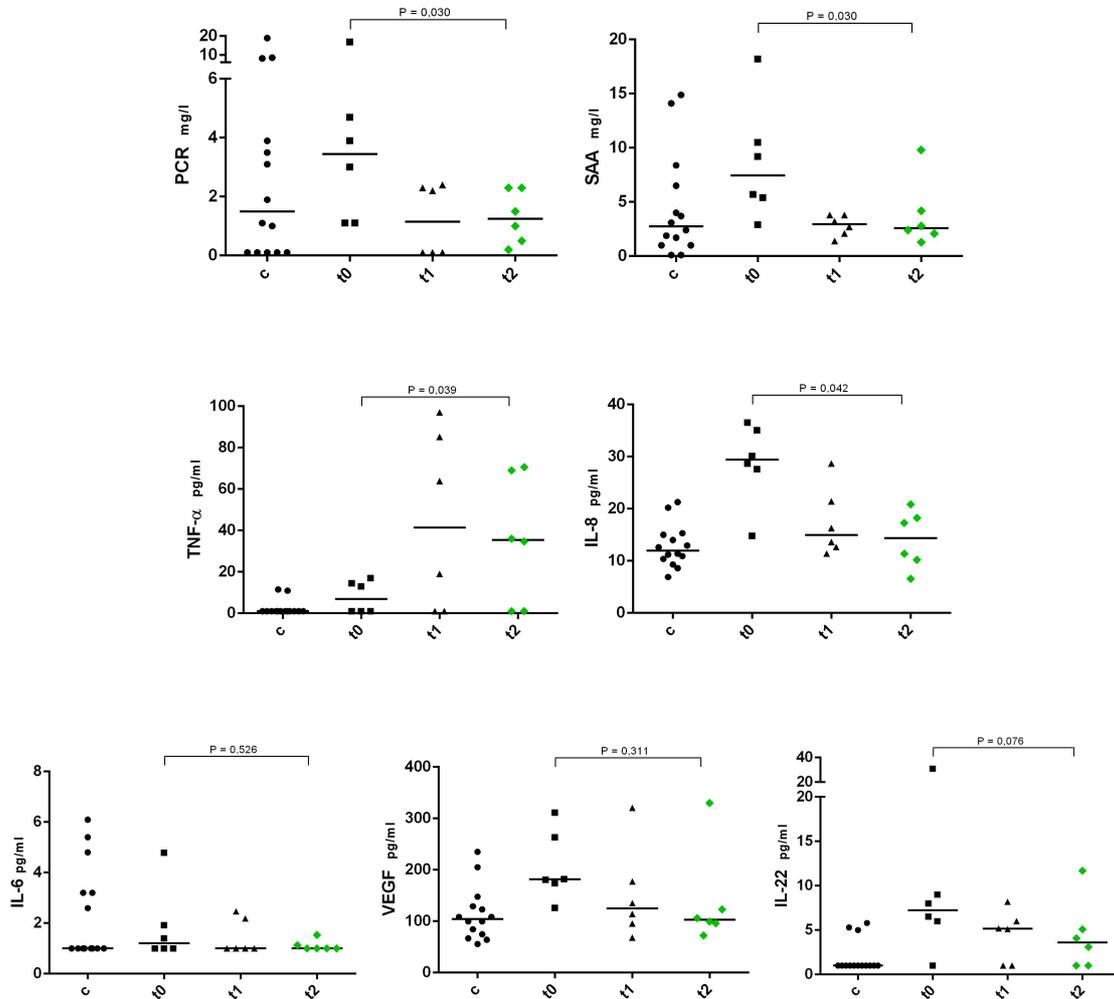


Figura 15. Niveles en suero de PCR, SAA, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, VEGF e IL-22, en controles y en aquellos pacientes que mantuvieron a largo plazo tratamiento con el mismo inhibidor del TNF- $\alpha$ . Se muestran los datos antes de iniciar tratamiento (t0), a las 16 semanas (t1) y a los 30 meses (t2).

### 4.3. Valoración de ARNm de citoquinas en biopsias cutáneas

En el análisis estadístico, los pacientes con psoriasis mostraron antes del tratamiento ( $t_0$ ) un aumento significativo respecto a controles sanos del ARNm en piel de TNF- $\alpha$  ( $p=0,000$ ), IL-1 $\beta$  ( $p=0,018$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0,015$ ), IL-17 ( $p=0,000$ ) e IL-22 ( $p=0,000$ ) (fig. 16).

En el análisis individual de las citoquinas proinflamatorias, se observó que 17 de los 18 pacientes mostraron elevación del ARNm de TNF- $\alpha$ , y 15 de 18 de IL-1 $\beta$ , respecto a la mediana de los controles. Sin embargo, los transcritos de ARNm de IL-6 y VEGF solo estaban aumentados en 5/18 y 8/18 de los pacientes, respectivamente (tabla 9). En cuanto a las citoquinas relacionadas con las diferentes respuestas adaptativas, todas mostraron a nivel basal un comportamiento similar. Los niveles de ARNm de IFN- $\gamma$  estaban elevados respecto a la mediana de los controles en 15 de los 18 pacientes, y los de IL-17 e IL-22, en 14/18 y 14/16 de los pacientes respectivamente (tabla 9).

A las 16 semanas de tratamiento, la expresión del ARNm de las 5 citoquinas que estaban elevadas a nivel basal disminuyó de forma significativa (TNF- $\alpha$  ( $p=0,011$ ), IL-1 $\beta$  ( $p=0,001$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0,010$ ) IL-17 ( $p=0,000$ ) e IL-22 ( $p=0,001$ )); alcanzándose valores de controles para IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-22 (fig. 16). Aunque el ARNm de VEGF no estaba elevado respecto a controles antes del tratamiento, sí se observó una disminución tras el tratamiento ( $p=0,004$ ).

A pesar de las diferencias observadas en el comportamiento de las citoquinas proinflamatorias en el análisis estadístico, individualmente a las 16 semanas del tratamiento el comportamiento de todas las citoquinas proinflamatorias fue similar, con un descenso de su expresión en 14/18, 16/18, 12/18 y 15/18 de los

pacientes para TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y VEGF, respectivamente. A destacar que todos los pacientes con elevación del ARNm de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22 a nivel basal disminuyeron sus niveles tras el tratamiento (tabla 9).

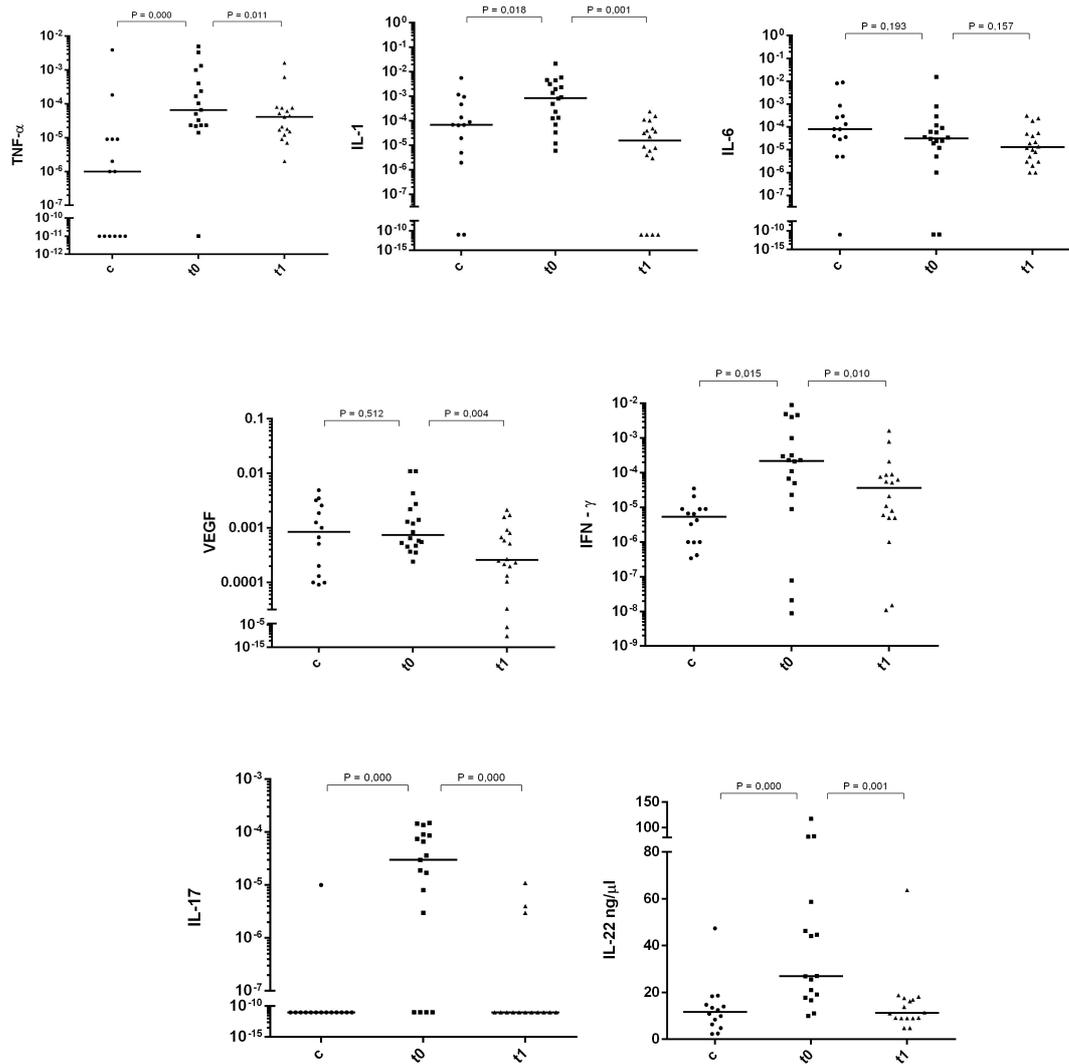


Figura 16. Expresión relativa de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF, IFN- $\gamma$  e IL-17; y expresión absoluta de IL-22, en biopsia cutánea, en controles y pacientes con psoriasis antes y a las 16 semanas de tratamiento con un inhibidor del TNF- $\alpha$ .

Tabla 9. Expresión de ARNm de citoquinas en biopsia cutánea, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles tras el tratamiento respecto a su estado basal (t0-t1) (ND: no disponible).

Pacientes	TNF- $\alpha$		IL-1 $\beta$		IL-6		VEGF		IFN- $\gamma$		IL-17		IL-22	
	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1	c-t0	t0-t1
1	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	=	=	ND	ND
2	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓	=	=	↑	↓
3	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	=	=	↑	↓
4	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓	=	↑	ND	ND
5	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓
6	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓
7	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
8	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
9	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
10	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
11	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓
12	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↑
13	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
14	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑
17	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
18	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
19	↑	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

#### **4.4. Correlación entre citoquinas en suero y ARNm de citoquinas en piel**

##### *4.4.1. Análisis global de la correlación entre citoquinas en suero y biopsia*

A continuación analizamos en aquellos pacientes de los que disponíamos datos a nivel cutáneo y sérico, la relación basal y los cambios tras el tratamiento en suero y piel de TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF e IL-22. Tanto IL-1 $\beta$  como IL-17 únicamente fueron detectadas a nivel cutáneo, e IFN- $\gamma$  solo se expresó en suero en 2 pacientes, por lo que no se incluyeron en este análisis.

TNF- $\alpha$  claramente mostró un patrón diferente al resto de citoquinas estudiadas. Por un lado, a nivel basal, 17 pacientes de los 18 disponibles, tenían elevación del ARNm de TNF- $\alpha$  en piel respecto a la mediana de los controles, pero solo 6 de ellos también tenían valores de proteína elevados en suero antes del tratamiento (tablas 7 y 9). Por otro lado, la mayoría de los pacientes mostraron una disminución de ARNm a las 16 semanas de tratamiento a nivel cutáneo, diferenciándose dentro de ellos dos grupos en cuanto al comportamiento en suero. En 7 pacientes la disminución en piel se acompañó de elevación de la citoquina en suero, observándose que todos ellos habían recibido tratamiento con etanercept. Por el contrario, en 6 pacientes la disminución de la citoquina en piel no se acompañó de modificaciones en los niveles séricos, manteniéndose en valores indetectables; en estos 6 pacientes el tratamiento recibido fue un anticuerpo monoclonal. Solo en un paciente en tratamiento con infliximab, la disminución en piel y suero fue paralela (fig. 17).

IL-6 también mostró antes del tratamiento un comportamiento diferente en piel y suero respecto a controles. Mientras que en suero 15 de los 18 pacientes presentaron niveles elevados, en piel solo se observaron niveles altos en 5 de

los pacientes (tablas 7 y 9). En cuanto a la respuesta tras la fase de inducción del tratamiento, en 12 de los 18 pacientes IL-6 disminuyó a nivel cutáneo, tanto en los 5 pacientes que presentaban niveles elevados en t<sub>0</sub>, como en pacientes que inicialmente presentaban valores por debajo de los controles. Esta disminución en piel fue paralela en suero en 7 de los 12 pacientes, aunque en dos pacientes la disminución sérica fue muy discreta (fig.18). Los 7 pacientes alcanzaron el PASI-75, 5 habían sido tratados con adalimumab o infliximab, y 2 con etanercept.

El comportamiento de VEGF a nivel basal fue similar al de IL-6. Mientras 16 pacientes de los 18 tenían niveles séricos más altos que controles, en piel solo 8 de los pacientes tenían expresión elevada de VEGF (tablas 7 y 9). Sin embargo, similar a lo observado para IL-6, a las 16 semanas de tratamiento en 15 de los 18 pacientes disminuyó la expresión a nivel cutáneo, tanto en los 8 pacientes que presentaban elevación al inicio del tratamiento, como en los que presentaban niveles más bajos que controles. En 13 de los 15, la disminución se observó también en suero (fig. 19). Todos los pacientes con evolución paralela en piel y suero alcanzaron el PASI-75, en 8 el tratamiento fue con anticuerpos monoclonales y en 5 con etanercept.

El comportamiento de IL-22 fue claramente diferente al observado para TNF- $\alpha$ , IL-6 y VEGF. Antes del tratamiento, 14 de los 16 pacientes de los que se disponían datos a nivel cutáneo y sérico presentaban elevación en suero, y también 14 mostraron expresión aumentada en piel (tablas 7 y 9). En los 14 con elevación en piel a nivel basal (t<sub>0</sub>) se produjo una disminución tras el tratamiento, en 12 de los cuales la disminución también se evidenció en suero

(fig. 20). Diez de los 12 alcanzaron el PASI-75, 7 recibieron tratamiento con anticuerpos monoclonales y 5 con etanercept.

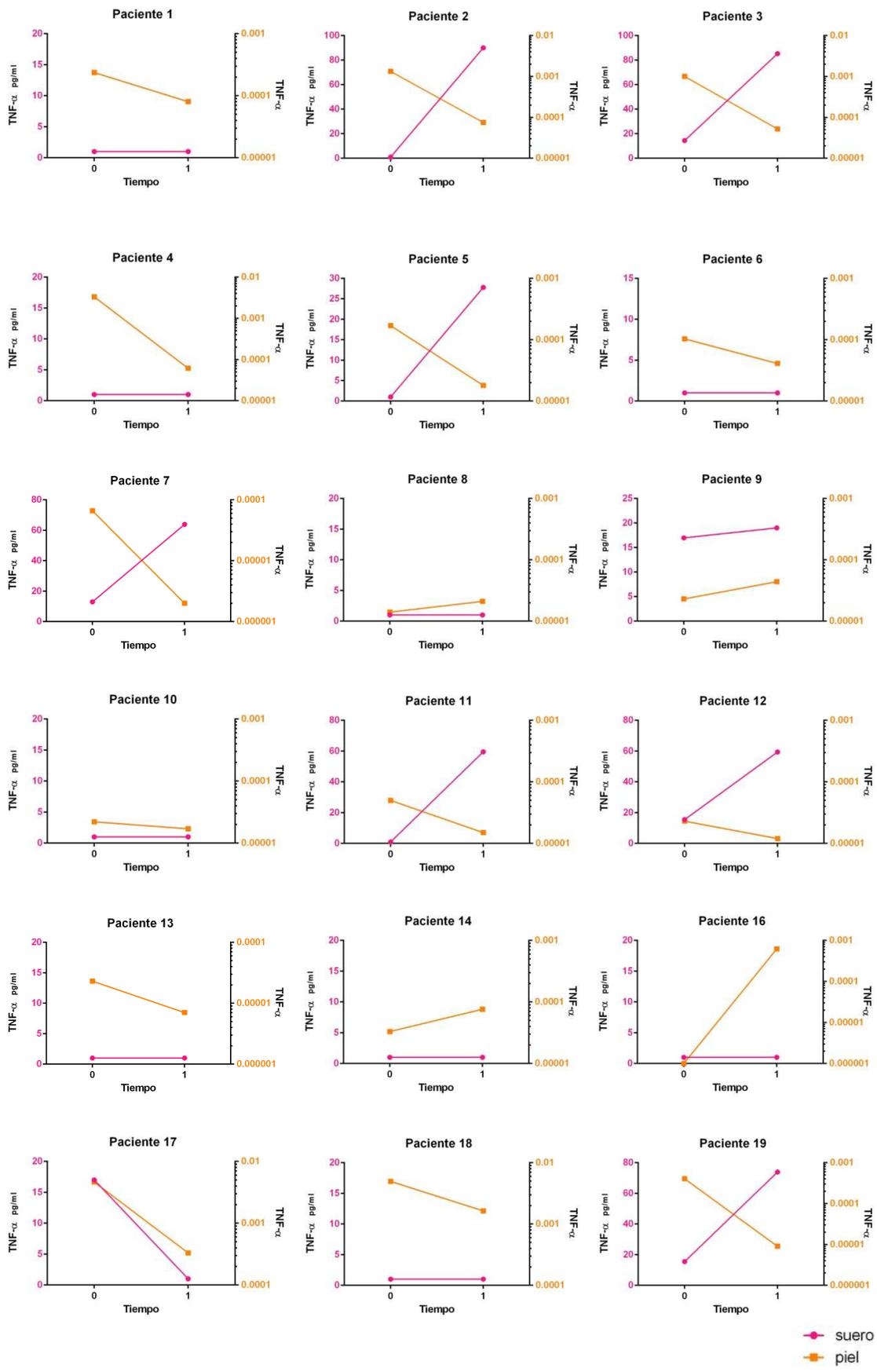


Figura 17. Expresión de TNF-α en suero (pg/ml) y ARNm en piel (UA/ml) de cada paciente.

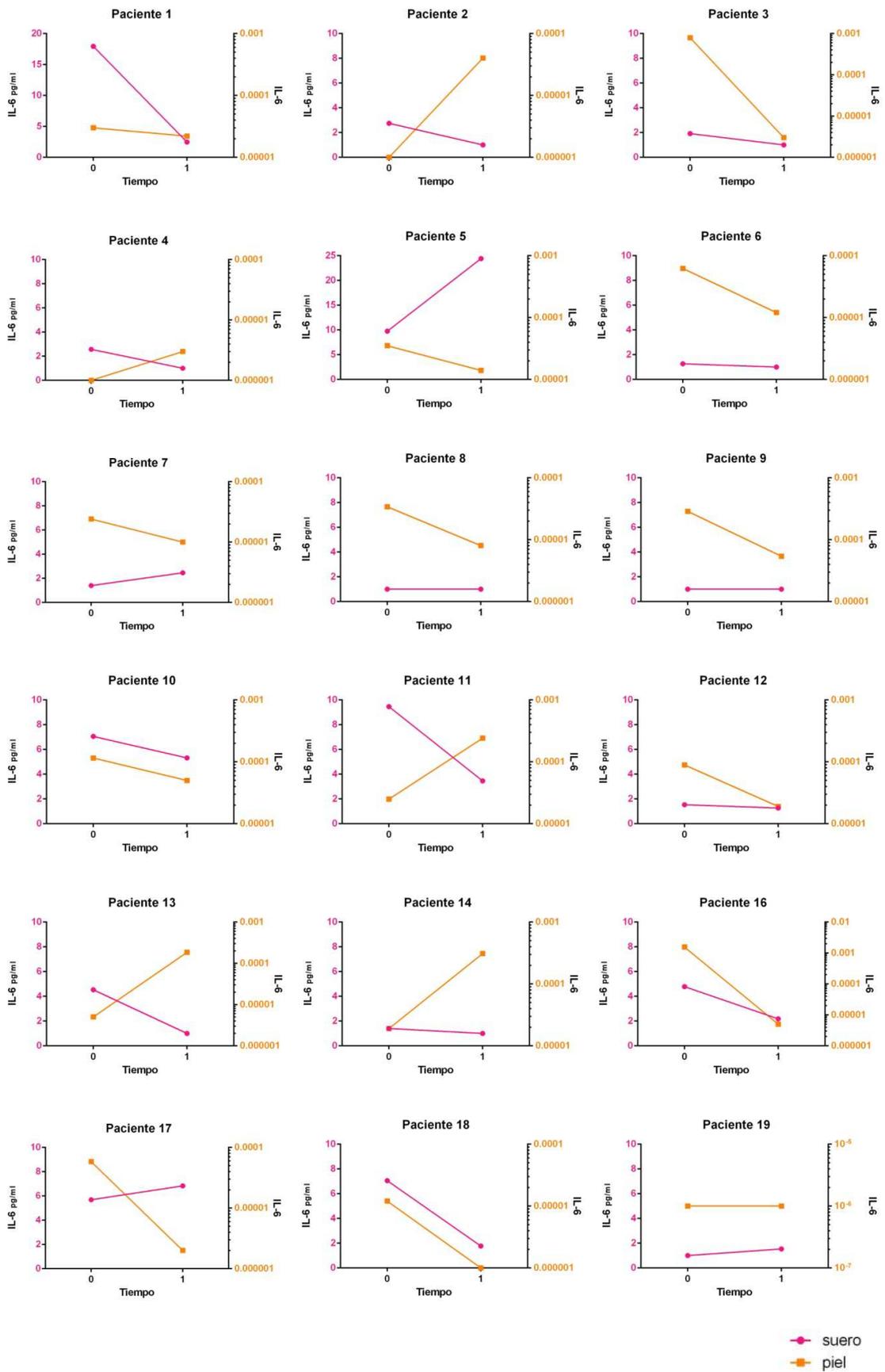


Figura 18. Expresión de IL-6 en suero (pg/ml) y ARNm en piel (UA/ml) de cada paciente.

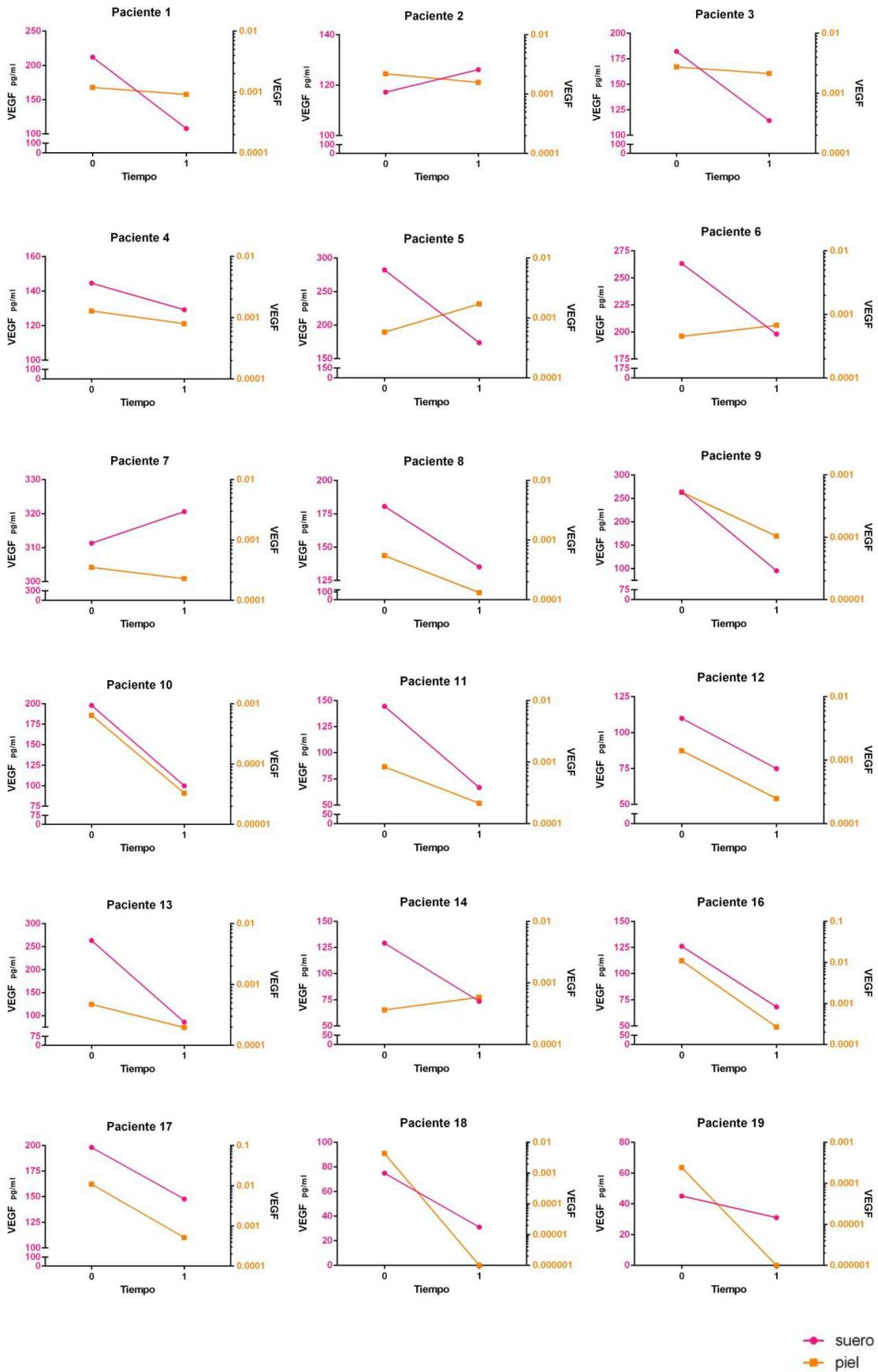


Figura 19. Expresión de VEGF (pg/ml) en suero y ARNm en piel (UA/ml) de cada paciente.

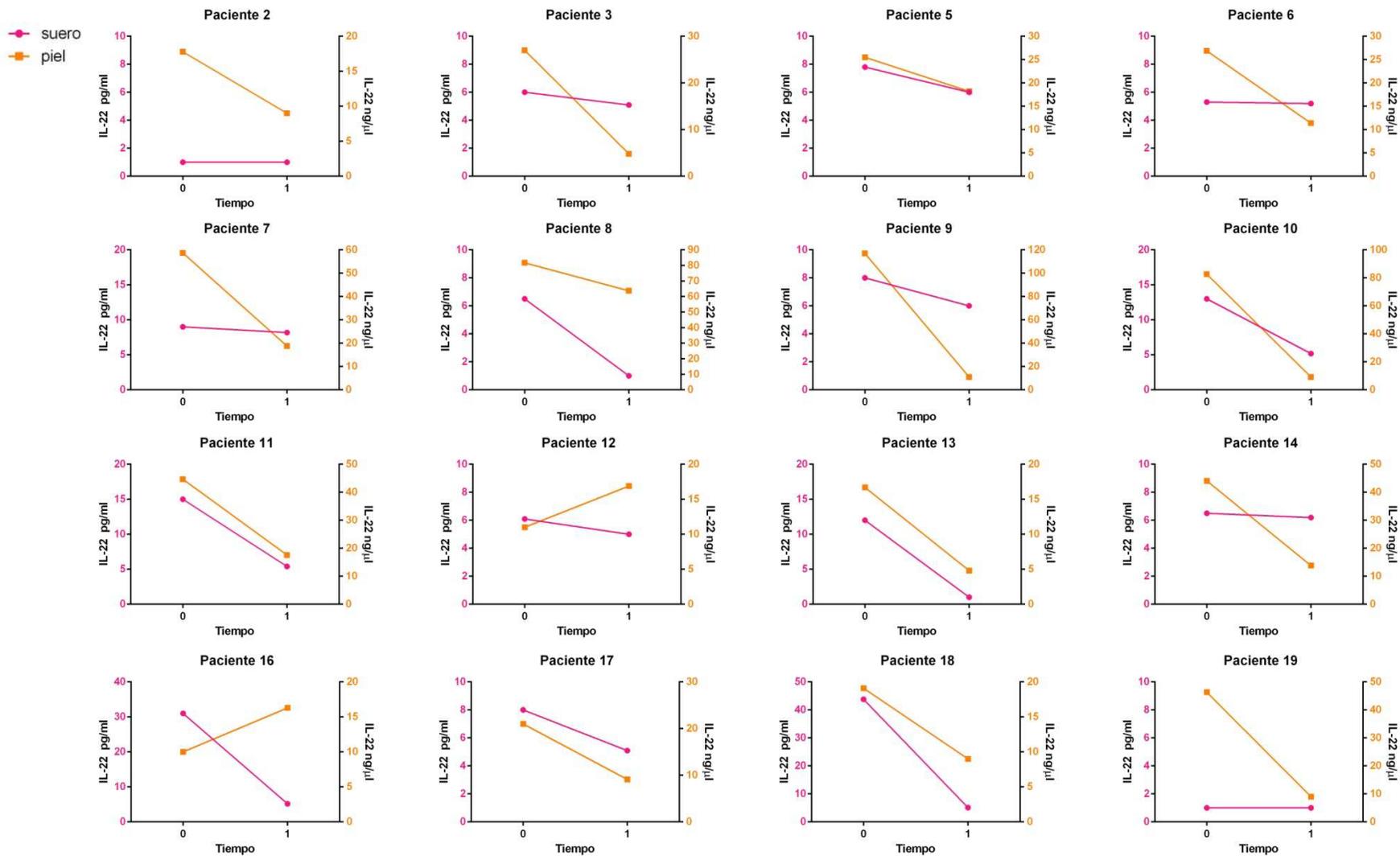


Figura 20. Expresión de IL-22 en suero (pg/ml) y ARNm en piel (ng/μl) de cada paciente.

#### *4.4.2. Análisis estratificado de la correlación entre citoquinas en suero y biopsia*

Con el fin de detectar diferentes patrones de comportamiento en función de variables clínicas o del tipo de tratamiento empleado, realizamos un análisis estadístico estratificado de los pacientes en función de: a) tratamiento recibido (etanercept / anticuerpos monoclonales), b) respuesta clínica, medida como PASI-75 y PASI-90, c) artropatía y d) HLA-Cw6. A pesar del pequeño tamaño muestral, los pacientes estaban balanceados en los subgrupos definidos por las cuatro variables, excepto para el PASI-75 que fue alcanzado por 15 de los 20 pacientes de la muestra. Sin embargo, dado el valor en la práctica clínica del PASI-75 como marcador de respuesta hemos creído conveniente realizar el análisis. En todos los subapartados se comprobó que las diferencias no se debiesen a diferencias basales entre subgrupos.

##### a) Tipo de tratamiento recibido

Al analizar la respuesta de las citoquinas en suero y de los niveles de ARNm en piel según el tipo de tratamiento se observó una respuesta diferente entre los dos grupos. En el análisis estadístico, en los pacientes tratados con etanercept el TNF- $\alpha$  en suero se elevó de forma significativa ( $p=0,004$ ), mientras que de forma contraria disminuyó su expresión cutánea ( $p=0,023$ ) (fig. 21). En el análisis individual, los 8 pacientes tratados con etanercept aumentaron los niveles en suero, mientras que disminuyeron en piel en 7 de los 8. Por el contrario, en el grupo de los pacientes tratados con anticuerpos monoclonales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de TNF- $\alpha$  en suero ( $p=0,999$ ) ni en piel ( $p=0,160$ ) (fig. 21). De

los 10 pacientes tratados con adalimumab o infliximab en 9 los niveles en suero se mantuvieron indetectables, y en piel disminuyeron en 7 de los 10. Sin embargo, en el grupo de los tratados con anticuerpos monoclonales sí se produjo una disminución paralela estadísticamente significativa de VEGF, tanto en suero como en piel, así como una disminución sérica de IL-6 (fig. 22), no observadas en el grupo de etanercept. No obstante, estos datos deben interpretarse con precaución dado el pequeño tamaño muestral.

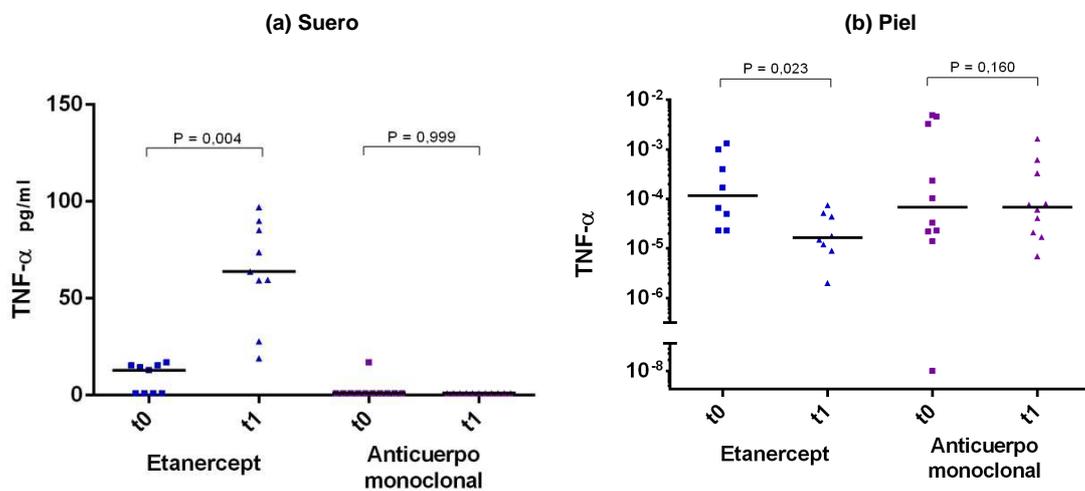


Figura 21. (a) Niveles en suero de TNF- $\alpha$  en pacientes tratados con etanercept o con anticuerpo monoclonal. A la semana 16, los niveles de TNF- $\alpha$  séricos solo se elevan en los pacientes tratados con etanercept. (b) A nivel cutáneo TNF- $\alpha$  disminuye significativamente en los pacientes tratados con etanercept.

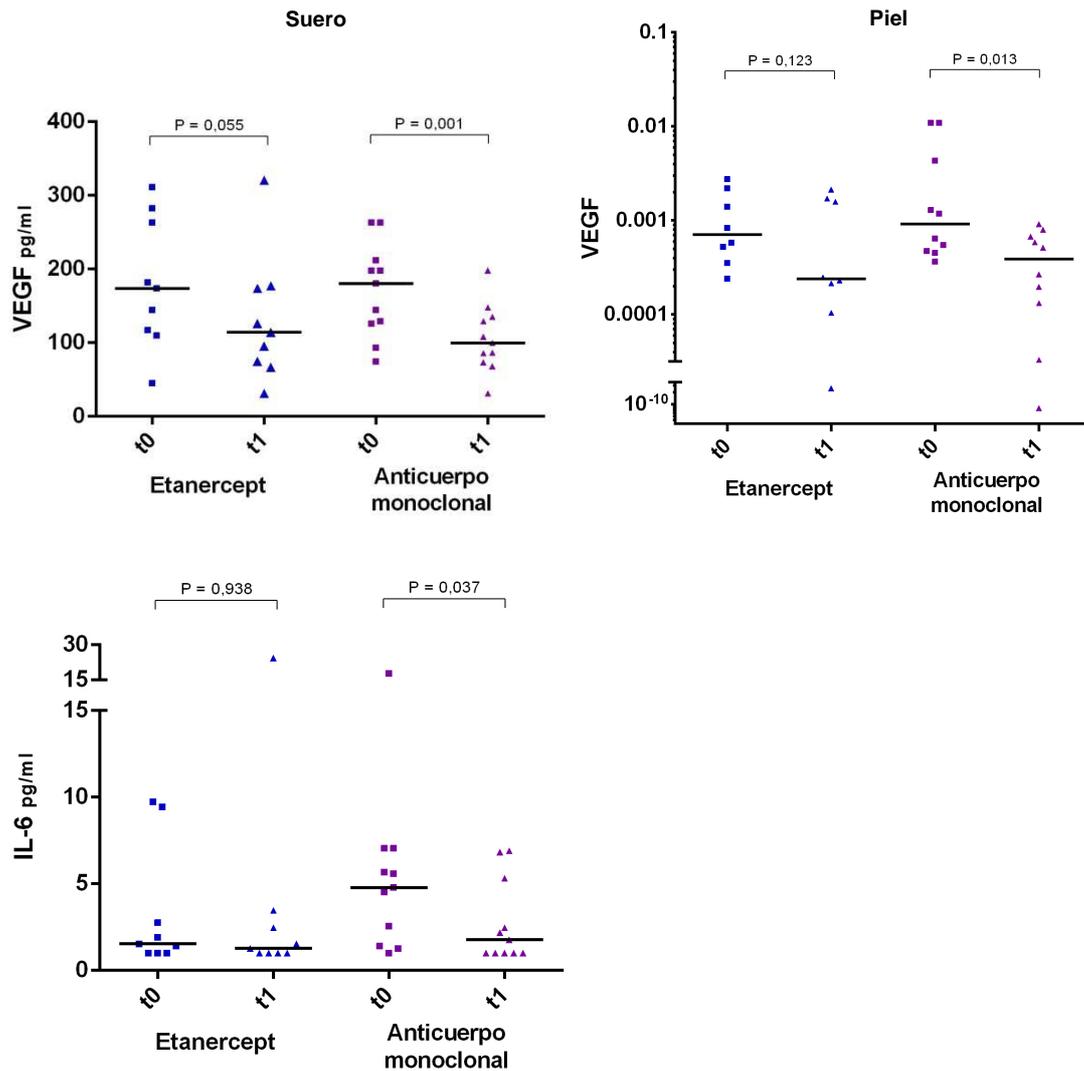


Figura 22. Diferencias en la expresión de VEGF e IL-6 en suero y/o piel en función del tipo de tratamiento recibido: etanercept o anticuerpo monoclonal.

### b) Respuesta clínica

En los pacientes que alcanzaron una respuesta PASI-75, a diferencia de los que no, disminuyó significativamente la expresión cutánea de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, VEGF, IL-17 e IL-22. A nivel sérico el TNF- $\alpha$  se elevó tras el tratamiento, mientras VEGF, IL-8, e IL-22 disminuyeron. También estos datos deben interpretarse con absoluta precaución dado el pequeño tamaño muestral y las

diferencias entre ambos subgrupos. Sin embargo, al valorar a los pacientes que alcanzaron una respuesta excelente medida como PASI-90, a diferencia de los que no, la disminución de la expresión cutánea se observó para VEGF, y en suero para IL-8 e IL-6 (fig. 23).

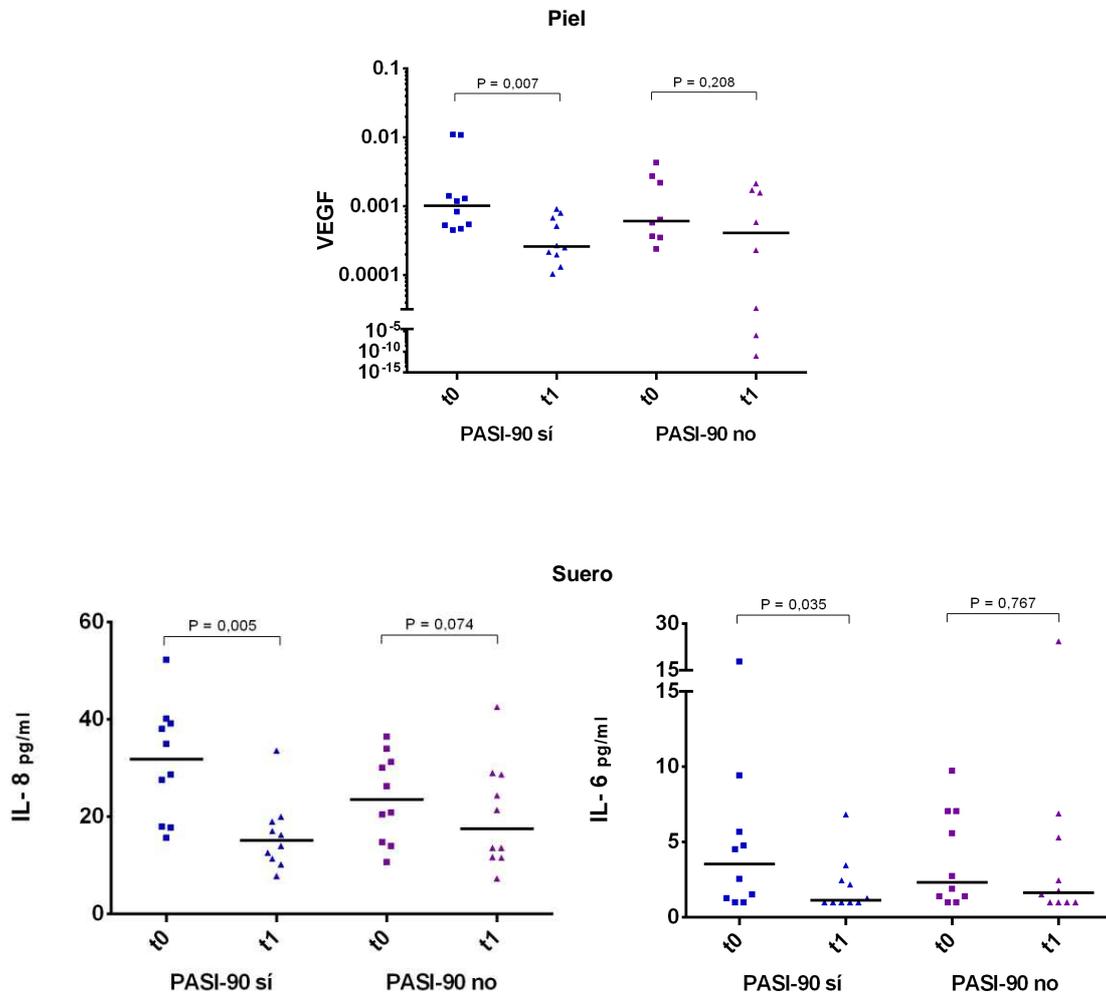


Figura 23. Variaciones en la expresión de VEGF a nivel cutáneo, y de IL-6 e IL-8 en suero de pacientes que alcanzan PASI-90, respecto a los que no.

### c) Artropatía

La respuesta inmunológica tras el tratamiento también fue diferente para los pacientes con o sin artropatía. En los pacientes con artropatía psoriásica, se

produjo una disminución de VEGF cutáneo. A diferencia, en los pacientes sin artropatía, la disminución de la expresión cutánea se produjo en TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, mientras que en suero se elevó el TNF- $\alpha$  (fig. 24).

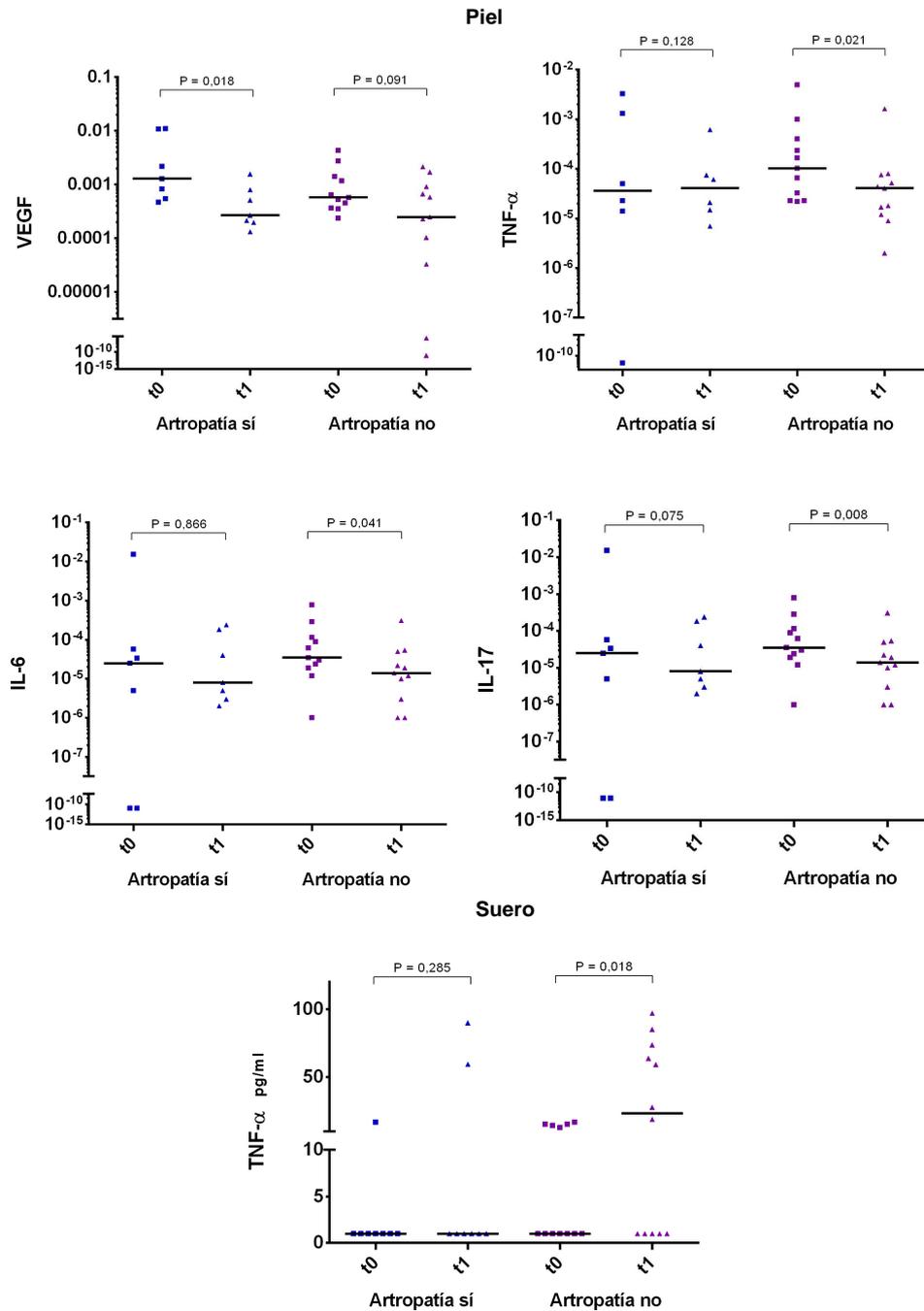


Figura 24. Variaciones en la expresión de citoquinas en piel y suero en pacientes con psoriasis, en función de la presencia o no de artropatía psoriásica.

#### d) HLA-Cw6

En los pacientes portadores de HLA-Cw6, a diferencia de los que no lo eran, disminuyeron significativamente IL-1 $\beta$  (HLA-Cw6+, p=0,005; HLA-Cw6-, p=0,069), IL-6 (HLA-Cw6+, p=0,071; HLA-Cw6-, p=0,575) y VEGF (HLA-Cw6+, p=0,007; HLA-Cw6-, p=0,263) a nivel cutáneo, no observándose diferencias en suero.

### **4.5. Estudio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica**

#### *4.5.1. Poblaciones linfocitarias T, B y NK*

El estudio de las poblaciones linfocitarias de sangre periférica mediante citometría de flujo mostró que en condiciones basales, antes del tratamiento, el número absoluto (cél/ $\mu$ l) de linfocitos T y NK en pacientes psoriásicos no difería de los controles (p=0,306, p=0,691, respectivamente). Sí se observó un aumento basal significativo en el número absoluto de linfocitos B CD19+ (p=0,033). No se observaron diferencias tras el tratamiento. Sin embargo, el estudio de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T sí mostró tras el tratamiento una elevación en los valores absolutos de los linfocitos CD4 (p=0,030) (fig. 25).

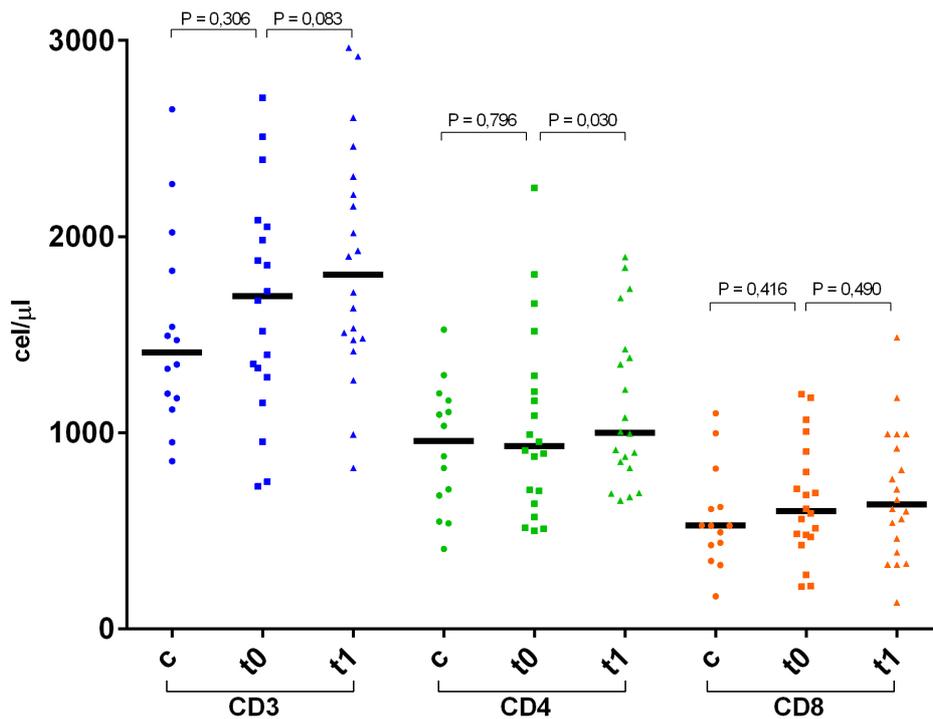


Figura 25. Poblaciones de linfocitos CD3+, CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en controles y pacientes, antes del tratamiento y a las 16 semanas.

#### 4.5.2. Análisis de linfocitos T reguladores

Puesto que en la literatura se ha descrito que una alteración en el número y/o la función de los linfocitos Treg puede estar en relación con la mayor susceptibilidad a enfermedades mediadas por linfocitos T,<sup>64, 65</sup> estudiamos en sangre periférica los linfocitos Treg que expresan el factor de transcripción FoxP3. Para ello, purificamos las células mononucleares de sangre periférica mediante un gradiente de Ficoll. Los linfocitos Treg comparten marcadores con los linfocitos T activados. Para seleccionar los Treg de forma rigurosa y diferenciarlos de los linfocitos T activados, que de forma transitoria pueden también expresar FoxP3, diferenciamos dos poblaciones de linfocitos: linfocitos

T activados (CD3+, CD4+, CD25+) y Treg (CD3+ CD4+, CD25+<sup>alto</sup>, FoxP3+, CD127-) (fig. 26).

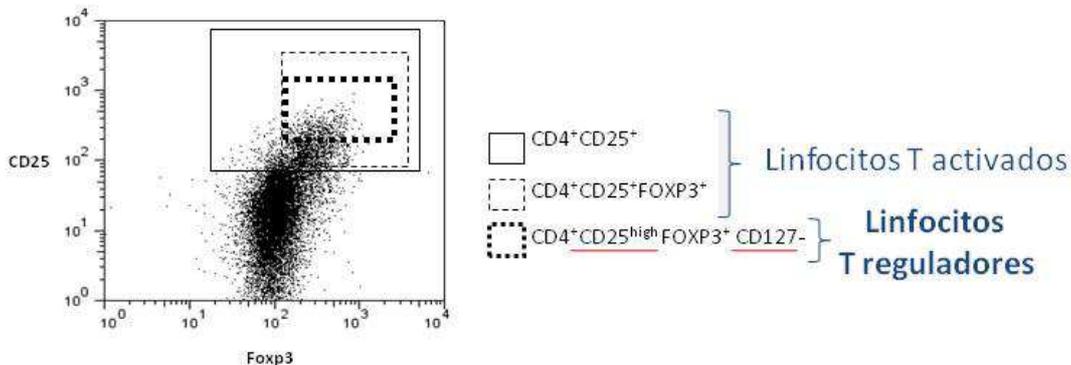


Figura 26. Selección y distinción de los linfocitos T reguladores y linfocitos T activados.

Observamos que el porcentaje de linfocitos T activados fue mayor en los pacientes a nivel basal (t0) que en los controles (p=0,002), sin observarse diferencias a las 16 semanas de tratamiento (p=0,575) (fig. 27).

En cuanto a los linfocitos Treg, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células entre los pacientes basalmente y los controles (p=0,641), pero sí un aumento tras el tratamiento (p=0,014) (fig. 28 y 29). En el análisis individual de los pacientes, antes del tratamiento 8 de los 20 tenían disminuido el porcentaje de Treg respecto a la mediana de los controles. Sin embargo, a las 16 semanas de terapia con anti-TNF en 15 de los 20 pacientes se observó un incremento porcentual del número de Treg (9 AbMo, 6 ETN), en uno no se modificó (ADL) y en 4 disminuyó (3 ETN, 1 IFX) (tabla 10).

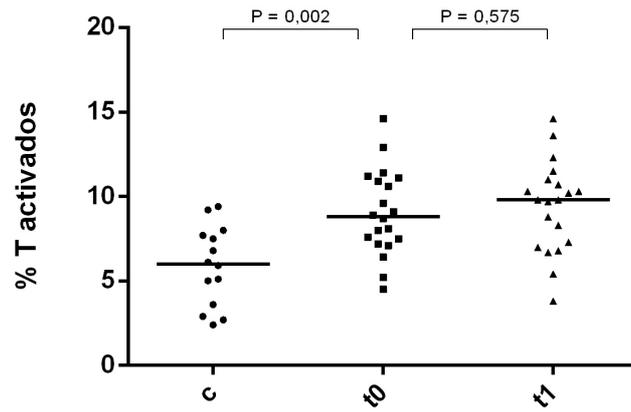


Figura 27. Linfocitos T activados en controles y pacientes, antes y a las 16 semanas de tratamiento.

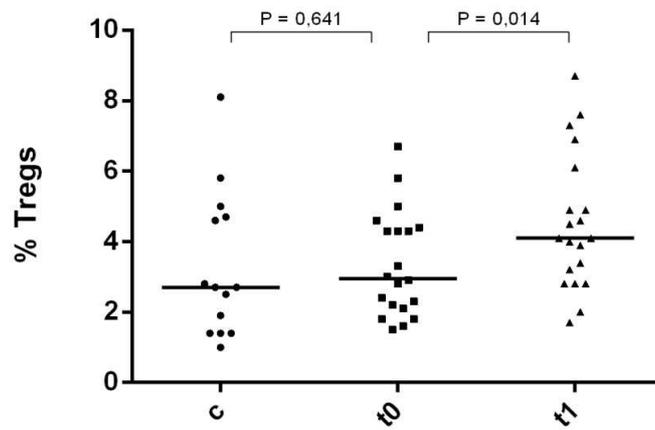


Figura 28. Niveles de linfocitos T reguladores en controles y pacientes con psoriasis tratados con inhibidores del TNF- $\alpha$ , antes y a las 16 semanas de tratamiento.

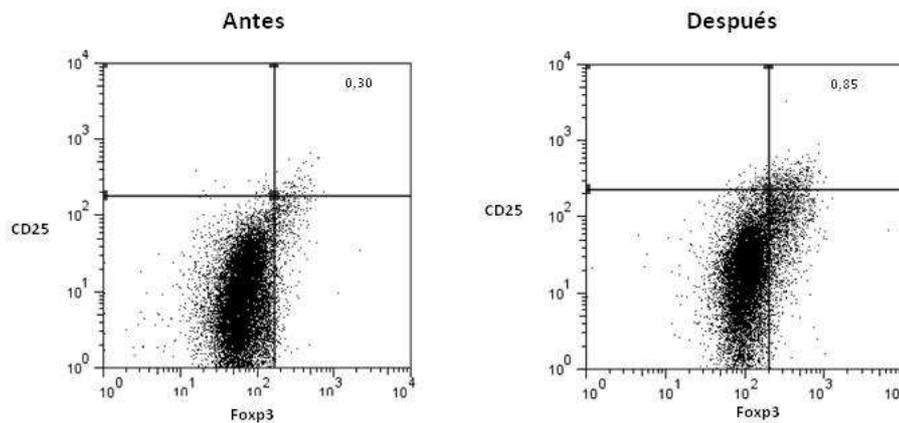


Figura 29. Ejemplo de un paciente tratado con adalimumab, en el que el porcentaje de linfocitos Treg aumentó a las 16 semanas de tratamiento.

Tabla 10. Linfocitos Treg en sangre periférica, niveles en cada paciente respecto a la mediana de los controles (c-t0) y niveles individualizados a las 16 semanas de tratamiento respecto a su estado basal (t0-t1).

Pacientes	Tratamiento	Treg %	
		c-t0	t0-t1
1	ADL	↓	↑
2	ETN	↑	↑
3	ETN	↑	↑
4	ADL	↓	↑
5	ETN	↑	↑
6	ADL	↑	↑
7	ETN	↑	↑
8	ADL	↓	↑
9	ETN	↓	↑
10	IFX	↓	↑
11	ETN	↑	↓
12	ETN	↑	↓
13	ADL	↑	=
14	ADL	↑	↑
15	ETN	↑	↑
16	IFX	↓	↑
17	IFX + MTX	↑	↓
18	ADL	↓	↑
19	ETN	↑	↓
20	ADL	↓	↑

En el análisis independiente de los pacientes tratados con anticuerpos monoclonales y los tratados con etanercept, a nivel basal no se observaron diferencias en los valores de Treg entre los dos subgrupos ( $p=0,152$ ). Tras las 16 semanas de tratamiento, solo se observó un incremento de Treg estadísticamente significativo en el grupo de pacientes tratados con anticuerpos monoclonales ( $p=0,032$ ) (fig. 30).

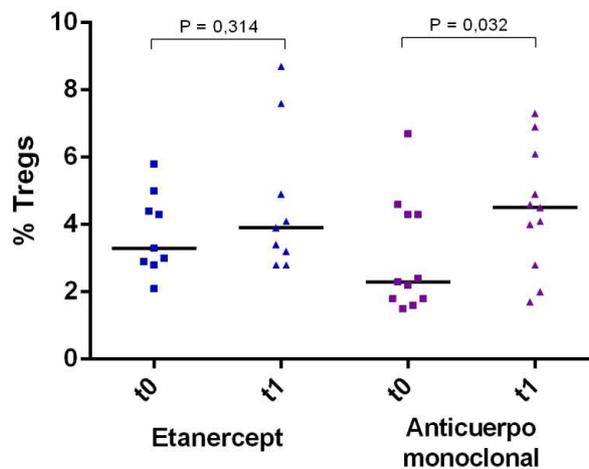


Figura 30. Porcentaje de Treg en pacientes tratados con etanercept frente a pacientes tratados con anticuerpos monoclonales.

Individualmente, el incremento de Treg no correlacionó con la respuesta clínica, en términos de PASI-75 ( $p=0,051$ ) y PASI-90 ( $p=0,192$ ), es decir, los pacientes en los que el tratamiento se acompañaba de mayor incremento de Treg no obtenían mejores índices PASI.

## **5. DISCUSIÓN**

En este estudio hemos analizado la respuesta de 20 pacientes adultos con psoriasis en placas moderada-grave al tratamiento con diferentes inhibidores del TNF- $\alpha$  en condiciones de práctica clínica habitual. La edad media de los pacientes de la muestra fue de 42 años, con un predominio del sexo masculino, y una duración media de la enfermedad de 17 años. Los pacientes han sido estudiados de forma global, desde un punto de vista clínico e inmunológico, tanto a nivel cutáneo como sistémico, tras la fase de inducción (16 semanas) del fármaco. Aquellos pacientes que mantuvieron el mismo tratamiento a largo plazo (n=6), bien de forma continua o intermitente, conservando la respuesta clínica, fueron además evaluados con posterioridad (a los 30 meses) para valorar si la respuesta inmunológica en suero tras la fase de inducción se mantenía.

A la hora de interpretar los resultados de este trabajo hay que tener en cuenta algunas consideraciones relevantes. Aunque el tamaño muestral es pequeño, lo que limita en parte la generalización de conclusiones especialmente a la hora de hacer comparaciones entre subgrupos, estos están bien equilibrados en cuanto a diferentes variables: tipo de tratamiento, presencia o no de artropatía, genotipo HLA-Cw6 y grado de respuesta clínica (PASI-90). A pesar del pequeño tamaño muestral, al tratarse de un trabajo clínico-experimental, creemos que los resultados obtenidos son novedosos y de interés.

En el diseño del trabajo fue prioritaria la comparación entre los diferentes tipos de fármacos anti-TNF, pues existen pocos trabajos publicados de esa naturaleza en psoriasis. Nos interesaba especialmente analizar las diferencias a nivel sistémico y cutáneo entre anticuerpos monoclonales y receptor soluble con el fin de determinar las bases inmunológicas que subyacen a los diferentes

mecanismos de acción y a las diferencias observadas clínicamente. Aunque los tres inhibidores del TNF- $\alpha$  han demostrado eficacia en el tratamiento de la psoriasis, el mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales es diferente al de la proteína de fusión. En nuestro estudio, por razones estadísticas, analizamos los resultados de adalimumab e infliximab dentro del mismo grupo asumiendo que, aunque varíe la vía de administración y en consecuencia la biodisponibilidad, conceptualmente el mecanismo de acción de ambos anticuerpos monoclonales es equiparable. Se sabe que la inmunogenicidad de los tres fármacos es diferente, siendo máxima en infliximab, y mínima en etanercept. Sin embargo, no consideramos que esto pueda influir en nuestros resultados por varios motivos. Primero, el estudio está realizado fundamentalmente en la fase de inducción, a las 16 semanas de tratamiento, por lo que no es probable que se hubiesen detectado anticuerpos neutralizantes de forma tan precoz. Segundo, hay estudios que demuestran que en psoriasis, a pesar de que efectivamente se detectan más anticuerpos frente a infliximab que con el resto, la supervivencia de infliximab es mayor que la de los otros dos anti-TNF.<sup>95</sup> Finalmente, en resultados que no se muestran en este trabajo, no observamos presencia de anticuerpos antifármaco en 4 pacientes que cambiaron de tratamiento ni en 3 de los que no cambiaron de anti-TNF.

Otra consideración es que en el estudio analizamos el efecto del bloqueo del TNF- $\alpha$  hasta la semana 16 de tratamiento, tras la fase de inducción. En el estudio de extensión a largo plazo (30 meses) solo analizamos la expresión de citoquinas en suero de aquellos pacientes respondedores con el mismo tratamiento, sin diferenciar entre tratamiento continuo e intermitente.

Finalmente, hay que tener en cuenta que en dos de los pacientes la administración del anti-TNF fue concomitante con la de metotrexato, y que esto podría haber modificado alguno de los resultados. Sin embargo, uno de los pacientes tenía enfermedad activa en el momento del inicio del biológico pese al tratamiento previo con metotrexato, y no se modificó su pauta y dosis al inicio del biológico ni durante el estudio, por lo que consideramos improbable que el tratamiento concomitante haya influenciado nuestros resultados de manera importante. Goedkoop y col. refuerzan esta afirmación en un estudio que compara infliximab frente a placebo por la ausencia de cambios significativos en los pacientes que reciben placebo y que continúan en tratamiento con metotrexato.<sup>96, 97</sup>

La eficacia a corto plazo de la terapia biológica en el tratamiento de la psoriasis en placas ha sido demostrada en varios ensayos clínicos para los tres anti-TNF.<sup>98-108</sup> En el global de nuestra muestra el 100% de los pacientes mostró una disminución del PASI tras la fase de inducción, el 90% alcanzó el PASI 50, el 75% (15/20) el PASI-75, y el 50% (10/20) alcanzó una respuesta óptima (PASI-90). Al analizar por separado los pacientes tratados con etanercept y los tratados con anticuerpos monoclonales, observamos que el porcentaje medio de mejoría del PASI en el grupo de los tratados con anticuerpos monoclonales fue mayor, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística. En nuestra serie de casos, el 67% de los pacientes tratados con etanercept alcanzaron el PASI-75 a la semana 16, siendo este resultado ligeramente superior a los resultados observados en los ensayos clínicos publicados, donde el 49% de los pacientes tratados con etanercept a la dosis de 50 mg 2 veces por semana alcanzan el PASI-75 en la semana 12, y el 59% a la semana 24.<sup>98,</sup>

<sup>99</sup> Para los pacientes tratados con etanercept 50 mg por semana, la respuesta PASI-75 es alcanzada por el 38% y por el 71% de los pacientes en la semana 12 y 24, respectivamente.<sup>100</sup> En el grupo de los anticuerpos monoclonales, el 82% de los pacientes de nuestra serie alcanzaron el PASI-75 tras la inducción. La eficacia PASI-75 observada en los ensayos clínicos de adalimumab e infliximab (5mg/kg) fue del 71-80% a la semana 16,<sup>102-104</sup> y 80-88% a la semana 10,<sup>105-108</sup> respectivamente. En ausencia de ensayos clínicos que comparen entre sí los diferentes inhibidores del TNF- $\alpha$ , varios meta-análisis han puesto de manifiesto diferencias en la eficacia durante la fase de inducción, siendo superiores infliximab y adalimumab, respecto a etanercept.<sup>109-113</sup> Estos datos son concordantes con lo observado en nuestra serie.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los pacientes tratados en la práctica habitual difieren de los pacientes tratados en los ensayos clínicos, causando pequeñas diferencias en términos de eficacia.<sup>114-120</sup> Estas diferencias se han atribuido, por un lado, a la selección diferente de pacientes; y, por otro, a las estrategias empleadas en el manejo del tratamiento.<sup>121, 122</sup> A diferencia de los ensayos clínicos, los pacientes tratados en la práctica diaria suelen ser pacientes resistentes a varios tratamientos y con comorbilidades.<sup>116, 118</sup> En nuestra serie, 11 de los 20 pacientes habían recibido dos o más tratamientos sistémicos convencionales con anterioridad al empleo del biológico, y tres habían sido tratados con los cuatro tratamientos convencionales (fototerapia, metotrexato, ciclosporina y acitretino). Además, en 7 de los 20 pacientes ya se había empleado algún tratamiento biológico con anterioridad. Ocho de los pacientes padecían artropatía psoriásica, aunque no se ha descrito que la

presencia de afectación extracutánea sea predictora de una peor respuesta cutánea.<sup>123, 124</sup> En cuanto a las estrategias de manejo, en la rutina diaria el uso concomitante de tratamientos tópicos es habitual, sin embargo, en un ensayo clínico que comparó adalimumab en monoterapia con el empleo simultáneo de adalimumab más calcipotriol/betametasona no se observaron diferencias en el PASI-75 a las 16 semanas de tratamiento.<sup>104</sup> En la práctica diaria además es frecuente obviar periodos de lavado entre tratamientos para evitar recaídas de la enfermedad, y en ocasiones asociar inicialmente un tratamiento sistémico para obtener una respuesta más rápida.<sup>122, 125, 126</sup> En nuestra serie el 15% de los pacientes (3 de 20) estaban en tratamiento con un sistémico clásico en el momento de iniciar la terapia biológica. En dos de ellos, uno con UVB-BE, que inició etanercept, y otro, con acitretino, que inicio infliximab, se suspendieron a las 4 y 8 semanas de tratamiento con el biológico. El tercer paciente en tratamiento combinado con metotrexato, inició adalimumab, manteniendo los dos hasta las 16 semanas. Solo en uno de los 20 pacientes, que padecía artropatía, se inició de forma concomitante infliximab más metotrexato. En definitiva, aunque nuestro estudio está basado en pacientes tratados en condiciones de práctica diaria, dada la heterogeneidad de los pacientes, es necesario ser cauteloso a la hora de analizar los datos presentados en este trabajo.

Pese al gran avance que ha supuesto la terapia biológica en el tratamiento de la psoriasis, existe un subgrupo de pacientes que fallan al tratamiento con biológicos, sin que todavía exista un fármaco al que todos los pacientes respondan. Definiendo fracaso terapéutico primario como la incapacidad de alcanzar una respuesta PASI-50 durante la fase de inducción,<sup>77, 127</sup> en la

literatura se describe que el 26% de los pacientes tratados con etanercept (50mg, 2 veces por semana) fracasan a las 12 semanas, y el 23% en la semana 24.<sup>98</sup> En el caso de adalimumab, el porcentaje de pacientes que no alcanza el PASI-50 en la semana 12 se establece en 24%,<sup>101</sup> y para infliximab (5mg/kg) en 3-9% en la semana 10.<sup>107, 108</sup> En nuestra serie, dos pacientes mostraron fracaso terapéutico primario, uno en tratamiento con etanercept y otro con adalimumab. Sin embargo, el paciente tratado con etanercept continuó con el mismo tratamiento a dosis de 50 mg/sem, obteniendo una respuesta aceptable y manteniendo la respuesta a los 33 meses de tratamiento continuo. Este paciente corresponde al grupo de pacientes respondedores lentos, que mejoran con el tratamiento continuo.<sup>128</sup> Los dos pacientes además tenían en común un PASI basal menor de 12. Dada la baja sensibilidad del índice PASI por debajo de 12 es posible que en estos dos casos el PASI no haya sido un buen indicador de gravedad.

Además, en un porcentaje variable de pacientes que responden durante la fase de inducción se ha puesto de manifiesto la pérdida de eficacia del tratamiento durante la fase de mantenimiento. En un estudio a largo plazo sobre la efectividad de etanercept a diferentes dosis, la respuesta PGA (Physician's Global Assessment) se mantiene menor o igual a 1 (blanqueada, casi blanqueada) en alrededor del 40% de los pacientes a los 3 y 12 meses. Sin embargo, a los 24 meses esa proporción disminuye hasta el 28,6%, manteniéndose hasta los 48 meses.<sup>129</sup> Tying y col. también observan una caída de la respuesta a etanercept alrededor del año. El mayor porcentaje de respondedores PASI-75 lo obtienen a las 48 semanas con un 63%, de estos solo el 74,4% mantiene la respuesta PASI-75 a la semana 96.<sup>130</sup> En el

seguimiento durante tres años de pacientes tratados de forma continua con adalimumab, de aquellos pacientes que habían alcanzado una respuesta PASI-75 a la semana 33, el 26% pierden la respuesta entre la semana 33 y 52, manteniéndose estable a los 2 años, y con un ligero descenso a los 3 años.<sup>131</sup> En el estudio EXPRESS que valora la respuesta al tratamiento continuo con infliximab, al igual que lo observado con adalimumab, también observan una caída de la respuesta antes del año. El 89% de los pacientes que alcanzan una respuesta PASI-75 a la semana 10 mantienen esta respuesta a los 6 meses y el 65% al año.<sup>108</sup> De nuestros 20 pacientes 6 presentaron fracaso secundario (pérdida de respuesta tras haber obtenido inicialmente una respuesta clínica) en el seguimiento a largo plazo, tres en tratamiento con etanercept, dos con adalimumab y uno con infliximab. Se ha descrito que las principales causas de fracaso secundario son la formación de anticuerpos anti-fármaco y/o la aparición de nuevas rutas patogénicas, en las que otras citoquinas diferentes a TNF- $\alpha$  juegan el papel patogénico principal.<sup>132-134</sup>

Desde un punto de vista práctico, a la hora de abordar los fracasos terapéuticos primarios o secundarios existen tres alternativas para optimizar los resultados: intensificar el tratamiento (aumentando dosis o disminuyendo el intervalo entre dosis), combinar con tratamientos sistémicos clásicos o cambiar de biológico.<sup>77</sup> En nuestra muestra en el paciente en tratamiento con adalimumab y fracaso primario la alternativa elegida para optimizar la respuesta fue la asociación con metotrexato, obteniendo un control adecuado de la enfermedad. De los 6 pacientes con fracaso secundario, 5 precisaron cambio de biológico, pese a que en 4 de ellos se intentó previamente la intensificación del tratamiento o la asociación con fototerapia. Ante estos datos

se plantea la posibilidad de si ante un fracaso primario o secundario es preferible el cambio de biológico a las otras dos alternativas. Según las directrices españolas actuales de tratamiento biológico de la psoriasis se puede plantear administrar tratamiento combinado o intensificar temporalmente la dosis de biológico, pero, en general, se dará preferencia a la sustitución por otro biológico.<sup>77</sup> En cuanto a cuál es el biológico preferido frente a un fracaso, la evidencia científica actual es insuficiente para establecer un orden idóneo.<sup>77</sup> No obstante, datos más recientes sugieren en artropatía psoriásica, en artritis reumatoide, y en enfermedad inflamatoria intestinal, que la presencia de anticuerpos anti-fármaco en fracaso secundario predice una buena respuesta a tratamiento con otro anti-TNF.<sup>135, 136</sup> Por lo tanto, la determinación combinada de la presencia de anticuerpos anti-fármaco anti-TNF y de sus niveles terapéuticos en el valle parecen útiles en la toma de decisiones.<sup>132-134</sup> En nuestra serie, solo encontramos un paciente en tratamiento con infliximab que presentaba anticuerpos anti-fármaco (datos no mostrados).

La principal ventaja que ofrecen los tratamientos biológicos ante una enfermedad de carácter crónico como la psoriasis es la posibilidad de tratamiento continuo dado su buen perfil terapéutico. En el caso de infliximab, el tratamiento continuo se considera de primera elección, no solo por demostrar mayor eficacia frente al tratamiento intermitente,<sup>137</sup> sino principalmente por el aumento de reacciones infusionales severas observadas en el grupo de tratamiento intermitente del ensayo clínico RESTORE2, que conllevó la interrupción del mismo.<sup>138</sup> El etanercept ha demostrado eficacia tanto en tratamiento continuo como intermitente, aunque ofrece mejores respuestas PGA y PASI en el tratamiento continuo.<sup>139, 140</sup> Sin embargo, cuando la

respuesta es evaluada por el paciente la satisfacción es similar en ambos grupos de tratamiento.<sup>141</sup> Varios estudios coinciden en que la respuesta al retratamiento con etanercept es del 83%, sin observarse efectos secundarios importantes.<sup>142, 143</sup> Las tasas de respuesta PASI-75 para los grupos de tratamiento continuo e intermitente (un único ciclo de interrupción y retratamiento) de la extensión abierta del estudio REVEAL con adalimumab fueron 75 y 73% a la semana 108, respectivamente. Además aquellos pacientes cuya respuesta cae por debajo del PASI-50 durante la interrupción del tratamiento, tienen peores tasas de respuesta en el retratamiento.<sup>144</sup> En otro estudio, Papp y col. encuentran que el 73% de los pacientes en los que se han realizado dos interrupciones de tratamiento alcanzan  $PGA \leq 1$  en el tercer ciclo de tratamiento. Sin embargo, observan que la presencia de anticuerpos frente a adalimumab aumenta el riesgo de fallo en el retratamiento con el mismo fármaco.<sup>145</sup> Por lo tanto, puesto que la psoriasis es una enfermedad crónica y la terapia biológica presenta un buen perfil terapéutico, el tratamiento de la psoriasis con agentes biológicos se debe plantear de forma continuada y a largo plazo. Esto es especialmente importante en pacientes que presentan recaídas rápidas al suspender cualquier tratamiento. No obstante, puede plantearse la interrupción en circunstancias tales como intervenciones quirúrgicas, embarazo, viajes o decisión del propio paciente. En aquellos pacientes con respuestas óptimas durante más de un año puede plantearse la reducción de la dosis o la frecuencia de administración, e incluso la interrupción del fármaco, según el criterio clínico y de acuerdo con el paciente.<sup>77</sup>

Entender por qué algunos pacientes no responden inicialmente a un tratamiento (fracaso primario), o incluso cuando se obtiene una respuesta por

qué el grado de la misma es variable entre pacientes, e identificar a aquellos pacientes que van a perder la respuesta inicial (fracaso secundario) es importante para el manejo de la enfermedad. Los mecanismos que subyacen a la variabilidad en la respuesta de un paciente a un determinado fármaco son todavía desconocidos, y probablemente sean el resultado de un perfil genético o un estado inflamatorio específico.<sup>127, 146</sup> La búsqueda de biomarcadores séricos que permitan delimitar mejor que la simple observación clínica las alteraciones inmunológicas subyacentes en cada paciente a lo largo de la evolución de la enfermedad es un objetivo deseable en el manejo de estos pacientes y, como tal, fue otro de los objetivos planteados en este trabajo.

En la actualidad, la psoriasis se considera una enfermedad inflamatoria crónica mediada inmunológicamente. La acción de diferentes estímulos sobre un sustrato genético susceptible, desencadena una cascada de señalización a través de citoquinas y quimioquinas entre queratinocitos, células endoteliales, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células presentadoras de antígeno. Una vez iniciada la cascada inflamatoria se genera un círculo vicioso que estimula la proliferación anormal de los queratinocitos y perpetúa la respuesta inflamatoria. Aunque se conocen gran parte de los circuitos que mantienen la enfermedad, no se conocen con exactitud los mecanismos exactos que desencadenan el inicio de la misma (fig. 4).<sup>36, 147</sup>

Entre los genes de susceptibilidad para la psoriasis el más frecuentemente relacionado es el HLA-Cw6, localizado en el locus PSOR1. El 50% de los pacientes de nuestro estudio eran portadores del alelo, frente al 14 % de los controles, siendo estos datos concordantes con la literatura.<sup>1, 16</sup> No hemos observado que los pacientes portadores de este alelo tuviesen un inicio de la

enfermedad más precoz, ni mayor frecuencia de antecedentes familiares de psoriasis. Aunque parece claro que la infección respiratoria por estreptococo puede desencadenar un brote de psoriasis en gotas, el papel del estreptococo en la patogenia de la psoriasis crónica en placas permanece controvertido.<sup>21</sup> En nuestra serie, no hemos observado relación entre la infección estreptocócica, evaluada mediante niveles de ASLO, y la psoriasis; ni una asociación entre infección estreptocócica y ser portador del alelo HLA-Cw6. Es posible que superantígenos de *Streptococcus pyogenes*, en consecuencia sin relación con presentación vía HLA, puedan ser relevantes en el inicio de la disregulación de la respuesta inmune observada en pacientes con psoriasis.<sup>148</sup>

Una vez iniciada la psoriasis, en la fase de mantenimiento las células dendríticas mieloides secretan mediadores pro-inflamatorios, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-23, que además favorecen la diferenciación de linfocitos Th0 a linfocitos Th1 y Th17 productores de IFN- $\gamma$  e IL-17 respectivamente. Las células Th17 también son las principales productoras de IL-22, aunque se ha descrito un subgrupo celular Th22 que exclusivamente produce esta interleuquina. Mientras TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 inducen la expresión de quimioquinas y el subsiguiente reclutamiento de células inmunes en la piel, la principal función de IL-22 es la inducción de proliferación aberrante de queratinocitos y la consiguiente hiperplasia epidérmica, de ahí que esta citoquina se considere de especial relevancia en la patogenia de la enfermedad.<sup>149</sup>

En nuestra serie confirmamos el papel relevante de las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22 en la patogenia de la psoriasis, pues observamos un aumento de la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22 en piel psoriásica respecto a controles sanos.

También se observó un aumento de las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Llama la atención en nuestra muestra el escaso número de pacientes que a nivel cutáneo mostraron elevación basal respecto a controles de IL-6 y VEGF, pese a ser citoquinas proinflamatorias directamente relacionadas con las anteriores. Aunque sorprendentemente no detectamos un aumento significativo de VEGF en la piel a nivel basal, sí observamos una disminución de su expresión tras el tratamiento. Creemos que el pequeño tamaño muestral y las diferencias en cuanto a evolución y tratamientos previos de los pacientes han podido influir en estos resultados. Tanto TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22 disminuyeron su expresión a nivel cutáneo tras 16 semanas de tratamiento con inhibidores del TNF- $\alpha$ . Todas se redujeron hasta niveles de controles sanos excepto TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

El perfil de citoquinas presente en la piel de pacientes con psoriasis es clave en el comportamiento de las células T autorreactivas. Las células T autorreactivas existen en la piel aparentemente normal de pacientes con psoriasis en un estado quiescente, a pesar de convivir con las células presentadoras de antígeno. Solo cuando estas son activadas y el ambiente inflamatorio local es el adecuado se desencadena la proliferación y producción de citoquinas de las células T autorreactivas, capaces de perpetuar el estado de inflamación.<sup>29</sup> La terapia con inhibidores del TNF- $\alpha$ , ha demostrado modulación de circuitos, tanto de inmunidad innata como adaptativa.<sup>85</sup> Zaba y col. han observado dos efectos tras el bloqueo de TNF- $\alpha$  con etanercept. En primer lugar, supresión rápida de la cascada clásica de inflamación modulada por TNF- $\alpha$ , que conduce a la producción de IL-1, seguida de IL-6 e IL-8. Y en segundo, disminución de la activación de las células dendríticas, presumiblemente estimuladas por TNF-

$\alpha$ , resultando en una disminución de la producción de IL-23, de la diferenciación de células Th0 a Th17 y Th22 y de su activación, evidenciado por la disminución de IL-17 e IL-22.<sup>86, 150</sup> Gottlieb y col. observan una cronología similar en la respuesta a etanercept, una rápida e intensa supresión de genes directamente regulados por TNF- $\alpha$  (IL-1, IL-6 e IL-8) durante el primer mes, seguida de una reducción progresiva de genes relacionados con las células dendríticas (IL-23p19) y la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ ) a los 3 y 6 meses.<sup>84</sup> Chiricozzi y col. refuerzan el papel conjunto de la inmunidad innata y adaptativa en la patogenia de la psoriasis, y su modulación por etanercept, al observar *in vitro* una mayor reducción de la expresión de genes sinérgicamente regulados por TNF- $\alpha$  e IL-17 comparado con genes regulados solo por TNF- $\alpha$ .<sup>48</sup> Otros grupos de investigación han obtenido resultados similares en la modulación de la respuesta Th1, Th17 y Th22 a nivel local tras el tratamiento con otros anti-TNF.<sup>151, 152</sup> Existe además evidencia de que la terapia anti-TNF, inhibe la activación del endotelio celular y la angiogénesis reflejada, entre otros, en la disminución de la expresión de VEGF a nivel local, que conllevaría a una disminución del infiltrado celular.<sup>96, 97, 153-156</sup> En nuestra muestra confirmamos que la terapia con inhibidores del TNF- $\alpha$ , regula a nivel local mecanismos de inmunidad innata (TNF- $\alpha$ , IL-1), respuesta Th1, Th17 y Th22 (IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22), y angiogénesis (VEGF). A nivel de ARNm en piel no observamos diferencias relevantes entre los dos grupos de anti-TNF.

Sin embargo, pese a la apariencia clínicamente normal de la piel tras el éxito del tratamiento y a la disminución de marcadores de inflamación, persiste un estado de inflamación subclínico, capaz de desencadenar la aparición de nuevas lesiones y que hasta el momento ningún tratamiento ha sido capaz de

resolver.<sup>157</sup> En un estudio de Suárez-Fariñas y col. tras 3 meses de tratamiento con etanercept, no observan una resolución total de la inflamación. Entre otros marcadores de inflamación, detectaron expresión residual de genes inflamatorios como IL-12p35, IL-22, IL-17 e IFN- $\gamma$ .<sup>158</sup> Es posible que persistan interacciones entre células dendríticas y linfocitos T residuales, no moduladas por el TNF- $\alpha$ , que conduzcan a niveles bajos de citoquinas, por debajo del umbral para desencadenar activación de la epidermis y enfermedad visible. Sin embargo, sigue sin estar claro qué moléculas y qué nivel de expresión es requerido para que la lesión sea clínicamente visible.<sup>158</sup> En nuestro trabajo, confirmamos estos resultados ya que tanto TNF- $\alpha$  como IFN- $\gamma$ , aunque disminuyeron tras 16 semanas de tratamiento, no regresaron a valores basales normales. No obstante hubiese sido necesario hacer un estudio longitudinal más largo y con mayor número de pacientes para poder corroborar este hecho. Estos datos abogarían por un tratamiento continuado sin interrupciones o, al menos, prolongado en el tiempo. Quizás con ello podrían minimizarse las alteraciones sistémicas y/o comorbilidades observadas frecuentemente en pacientes con psoriasis.

En los últimos años se ha prestado atención al riesgo elevado que tienen los pacientes con psoriasis de desarrollar comorbilidades como artropatía, síndrome metabólico, diabetes, enfermedad cardiovascular y depresión, resaltando el carácter sistémico de la enfermedad.<sup>159</sup> En realidad, algunos de los circuitos inflamatorios que mantienen la enfermedad cutánea son compartidos por dichas comorbilidades.<sup>160</sup> Durante periodos de enfermedad cutánea activa, se produciría la liberación desde la piel de citoquinas proinflamatorias a la circulación sistémica, que podrían iniciar o participar en las

comorbilidades observadas. De forma análoga, hormonas y citoquinas inflamatorias liberadas en condiciones como obesidad, diabetes, y aterosclerosis, comunes en pacientes con psoriasis, influirían en la patogénesis de la placa de psoriasis, promoviendo un estado inflamatorio que podría aumentar la severidad de la psoriasis ya instaurada o promover reactivaciones.<sup>160</sup> Así, por ejemplo, TNF- $\alpha$ , IL-6 y otras citoquinas conocidas genéricamente como adipoquinas producidas en cantidades elevadas por adipocitos y macrófagos del panículo adiposo en pacientes obesos podrían jugar un papel relevante.<sup>160</sup> En este sentido se ha descrito también que en estados de hiperinsulinemia como la obesidad o el síndrome metabólico existen niveles elevados y mantenidos de VEGF.<sup>160</sup> Especial importancia tiene la psoriasis como factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular por la mortalidad asociada.<sup>161</sup> Se postula que la inflamación crónica cutánea mediada por citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 y la angiogénesis crónica necesarias para mantener la psoriasis provocan disfunción endotelial y consecuentemente favorecen la aterosclerosis.<sup>162, 163</sup> También citoquinas producidas por linfocitos Th17 se han relacionado con la aterosclerosis, observándose niveles elevados de IL-17A/IL-17F en todos los estadios del desarrollo de la placa de aterosclerosis, e infiltración de células T CD4+ que expresan IFN- $\gamma$  e IL-17 concomitantemente.<sup>164</sup> Los pacientes con síndrome coronario agudo, además de mostrar un aumento de los mediadores relacionados con los linfocitos Th17, presentan disminución de linfocitos T reguladores FoxP3 y de sus mediadores IL-10 y TGF- $\beta$ , demostrando un perfil celular y de citoquinas similar al de la psoriasis.<sup>164</sup> Aunque inicialmente IL-22 no se ha relacionado con la aterosclerosis ni la enfermedad cardiovascular,<sup>164</sup>

recientemente Fabbrini y col. han observado un aumento de células Th17 y Th22 en el tejido adiposo de pacientes obesos con alteraciones metabólicas, a diferencia de obesos metabólicamente normales y sujetos delgados, acompañado de un aumento de las concentraciones de IL-22 en plasma. Sugieren que las citoquinas liberadas por estas células contribuirían a la patogénesis de la resistencia a la insulina.<sup>165</sup> La relación entre alteración cutánea y comorbilidades también ha sido comprobada por Suárez-Fariñas y col. en estudios del transcriptoma, donde muestran la asociación de genes sobreexpresados en la placa de psoriasis con vías funcionales asociadas con enfermedad metabólica y riesgo cardiovascular.<sup>166</sup> Al igual que la enfermedad cardiovascular, la artropatía psoriásica comparte muchos mecanismos inmunopatológicos con la enfermedad cutánea.<sup>167, 168</sup> Si el desarrollo de las comorbilidades se precipita o mantiene por mediadores inflamatorios que se inician en la piel, es lógico predecir que los tratamientos sistémicos de la psoriasis puedan mediar en la resolución de las comorbilidades asociadas.<sup>169-</sup>

172

La búsqueda de biomarcadores séricos no invasivos de utilidad en el seguimiento de estos pacientes fue otro de los objetivos planteados en este trabajo. Permitirían, por una parte, delimitar mejor que la simple observación clínica las alteraciones inmunológicas subyacentes en cada paciente a lo largo de la evolución de la enfermedad y, por otra, contribuir a identificar las comorbilidades asociadas. De esta manera, podrían dirigir la toma de las decisiones terapéuticas más apropiadas en estos pacientes. La identificación de marcadores de inflamación sistémica tendría en primer lugar un valor pronóstico, siendo útiles para predecir la evolución de la enfermedad y el riesgo

de enfermedad metabólica, eventos cardiovasculares y otras comorbilidades; y en segundo lugar, facilitaría la instauración de tratamiento precoz y su monitorización, disminuyendo el impacto psicosocial y metabólico.<sup>173</sup> Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha con algunos de estos biomarcadores en psoriasis han obtenido resultados discrepantes.<sup>146, 174</sup>

Entre los marcadores inflamatorios sistémicos clásicos, la PCR ha sido el marcador más estudiado. Los pacientes con psoriasis con frecuencia presentan niveles más elevados que controles sanos.<sup>175-178</sup> Sin embargo, la correlación de PCR con la actividad clínica de la psoriasis a nivel cutáneo ha mostrado resultados contradictorios.<sup>176, 177</sup> Esto es debido a que la PCR está influenciada por la artropatía psoriásica, la enfermedad cardiovascular o el índice de masa corporal.<sup>177-179</sup> Los resultados de varios estudios sí son superponibles en cuanto a la disminución de los niveles de PCR tras el tratamiento, incluidos los inhibidores del TNF- $\alpha$ .<sup>180-182</sup> Aunque Dogan y col. propusieron que la SAA sería un marcador más específico que la PCR en la evaluación de inflamación causada específicamente por la psoriasis al no relacionarse con el índice de masa corporal,<sup>183</sup> Choudhury y col. relacionaron los niveles de SAA con diabetes y eventos coronarios, comorbilidades asociadas a la psoriasis.<sup>179</sup> En nuestra serie de casos aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en los niveles de PCR y SAA entre pacientes y controles sanos, sí se observó una tendencia clara a presentar niveles más elevados basalmente en los pacientes con psoriasis. A las 16 semanas del tratamiento sí observamos una disminución significativa de la PCR, que se mantuvo en aquellos pacientes que continuaron con el tratamiento y buena respuesta clínica a los 30 meses. Aunque para la SAA no observamos diferencias

estadísticamente significativas tras la fase de inducción sí se observó una tendencia a presentar niveles más bajos que los basales. Además en el análisis de los 6 pacientes seguidos a 30 meses el test de Friedman sí mostró significación estadística para SAA. Con estos datos concluimos que en nuestra serie, los valores de PCR y SAA disminuyen tras tratamiento con cualquiera de los anti-TNF y que SAA no es mejor marcador que PCR.

Igualmente las publicaciones sobre la correlación entre niveles séricos de citoquinas y la severidad de la enfermedad también han mostrado resultados contradictorios.<sup>174</sup> La mayor parte de las citoquinas pueden ser producidas por muchas células diferentes y ejercen efectos pleiotrópicos. Los valores plasmáticos de citoquinas son reflejo de la producción a diferentes niveles y por distintos tipos celulares y, por ello, no son únicamente reflejo directo de lo que ocurre exclusivamente en la piel psoriásica. Por ello, su estudio podría aportar una visión global, incluyendo comorbilidades, de la situación del paciente con psoriasis. Además, la comparación de los niveles séricos con los niveles producidos a nivel cutáneo y su modificación o no tras el tratamiento, podrían dar una visión más clara de cuáles podrían ser las citoquinas más relevantes desde un punto de vista patogénico en la piel, cuales podrían estar más relacionadas con el estado proinflamatorio y las comorbilidades, y cómo los diferentes fármacos anti-TNF podrían modular unas y otras. La mayoría de los estudios indican que los pacientes con psoriasis tienen niveles séricos elevados de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, y factores proangiogénicos como VEGF.<sup>146, 174</sup> Se ha publicado que el tratamiento con etanercept produce una disminución significativa en suero de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  en pacientes con psoriasis.<sup>184</sup> Igualmente se ha descrito que infliximab

disminuye los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6 y VEGF en pacientes con artropatía psoriásica.<sup>185</sup> También se han demostrado niveles circulantes de IL-22 elevados.<sup>186</sup> Sin embargo, pese al papel crucial de IL-17 en la patogenia de la psoriasis, no se han encontrado datos consistentes sobre su elevación en suero.<sup>146, 174</sup> El tratamiento con etanercept, a diferencia de acitretino, ha demostrado disminución de los niveles séricos de IL-17 e IL-22.<sup>187</sup> La diversidad de los resultados obtenidos, probablemente influenciada por tamaños muestrales pequeños y por las diferentes técnicas empleadas, ha llevado al desarrollo de meta-análisis, que tratan de combinar los resultados de estudios individuales para aumentar la posibilidad de encontrar efectos reales. Recientemente Dowlatshahi y col. realizaron un meta-análisis para cuantificar la inflamación sistémica en pacientes con psoriasis severa, encontrando evidencia de inflamación sistémica leve, medida por la elevación de IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR, E-selectina e ICAM-1 en suero de pacientes respecto a controles. No obstante, la elevación fue discreta e independiente de la severidad clínica de la enfermedad cutánea, por lo que concluyen que no serían útiles como marcadores de severidad de enfermedad.<sup>188</sup> Una de las razones que puede contribuir a la variabilidad en los resultados entre estudios es la presencia de comorbilidades.<sup>174</sup> De manera interesante, niveles elevados de PCR e IL-6 se han propuesto como marcadores útiles para la detección precoz de artropatía en pacientes con psoriasis.<sup>189</sup> En nuestra serie hemos detectado un aumento de la expresión basal en suero de las citoquinas IL-8, VEGF e IL-22 en pacientes con psoriasis respecto a controles, y además IL-22 y VEGF se correlacionaron con el PASI. Aunque IL-6 también mostró tendencia a estar más elevada en pacientes que en controles no alcanzó significación

estadística. Sin embargo, TNF- $\alpha$  no mostró aumento basal respecto a controles. Las citoquinas IL-1 e IL-17, elevadas a nivel cutáneo, no se detectaron en suero, e IFN- $\gamma$  e IL-12 solo se detectaron en 2 pacientes. Es posible que la sensibilidad de la técnica empleada no fuese suficiente para la detección de pequeñas concentraciones séricas de dichas citoquinas. Tras 16 semanas de tratamiento, los valores séricos de IL-6, IL-8, VEGF e IL-22 disminuyeron, sin alcanzarse significación estadística para IL-6. Aunque TNF- $\alpha$ , no mostró aumento basal respecto a controles, sí se observaron diferencias tras el tratamiento que, llamativamente, fueron dependientes del tipo de anti-TNF utilizado, aumentando los valores séricos solo en el grupo tratado con etanercept. Este aumento de TNF- $\alpha$  tras tratamiento con anti-TNF ha sido descrito con anterioridad en artritis reumatoide.<sup>190</sup> También ha sido descrito en pacientes con artritis reumatoide tratados con anti-IL6 R (Tocilizumab).<sup>191</sup> Aunque su mecanismo no es claro, probablemente se trate de TNF- $\alpha$  inmunoreactivo, pero no funcionalmente activo, formando inmunocomplejos. En nuestra muestra además hemos observado que los 6 pacientes que se siguieron a 30 meses con buena respuesta clínica y el mismo fármaco tenían tendencia a mantener la respuesta obtenida a las 16 semanas para TNF- $\alpha$ , IL-8, VEGF e IL-22. Sin embargo, en la interpretación de los resultados en suero hay que tener en cuenta la gran variabilidad de los niveles de citoquinas tanto en pacientes como en controles, y la no existencia de valores de referencia. Esto es debido a la existencia de polimorfismos en los genes de citoquinas que condicionan que los individuos produzcan basalmente cantidades diferentes, por lo que más que las diferencias entre controles y pacientes la importancia de la interpretación de los datos radica en las diferencias entre pacientes antes y

después del tratamiento. Otro de los resultados a destacar en nuestro estudio fue la correlación entre los marcadores séricos de inflamación clásicos PCR y SAA con IL-6 e IL-22, así como la correlación entre IL-6 e IL-22.

Desde un punto de vista patogénico, resultan de especial interés las discrepancias observadas entre los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF e IL-22 y la detección de su ARNm en piel. Observamos tres comportamientos diferentes entre estas 4 citoquinas. En primer lugar, IL-22 fue la única citoquina donde se observaron de forma paralela niveles séricos y ARNm cutáneo elevados basalmente, con una clara disminución tras las 16 semanas de tratamiento en ambos. Por el contrario, IL-6 y VEGF mostraron un comportamiento similar entre ellas, observándose que a nivel basal la mayoría de los pacientes tenían un aumento de los niveles en suero, sin incremento de transcritos en piel. Sin embargo, tras el tratamiento se observó disminución de ambos. Por último, se observó incremento de transcritos de TNF- $\alpha$  a nivel basal, pero no aumento de TNF- $\alpha$  sérico. Es llamativo que solo 6 de los 20 pacientes de nuestra muestra presentaron elevación basal sérica de TNF- $\alpha$ . La ausencia de niveles circulantes altos de TNF- $\alpha$  también se ha descrito en otras enfermedades que responden a anti-TNF, como en artritis reumatoide, donde la mayor parte de los pacientes que responden a tratamiento no tienen niveles de TNF- $\alpha$  circulantes detectables, lo que demuestra que lo importante es la producción local.<sup>192</sup> Esta observación es acorde con la propiedad de la mayoría de las citoquinas de actuar a nivel local, bien en la misma célula que la secreta (acción autocrina) o bien en una célula vecina (acción paracrina). Tras el tratamiento la mayoría de los pacientes presentó una disminución de TNF- $\alpha$  en piel con un comportamiento en suero diferente en función del tipo de anti-TNF

empleado. Por lo tanto, en base a los resultados comparativos entre los niveles séricos y los niveles de ARNm antes y después de tratamiento, las citoquinas que estarían directamente implicadas en la patogenia de la enfermedad a nivel cutáneo serían TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22, claramente alteradas en piel y modificadas con el tratamiento. Por otro lado, las citoquinas que estarían más relacionadas con la actividad inflamatoria global y las comorbilidades serían IL-6 y VEGF. IL-22 fue la citoquina que mejor correlación mostró en nuestra serie entre la piel y el suero, por lo que además de estimular la proliferación aberrante de queratinocitos a nivel local, también ejercería funciones a nivel sistémico. Por otro lado, en nuestro estudio la regulación de TNF- $\alpha$  sería dependiente del tipo de anti-TNF empleado, lo que indicaría mecanismos de acción diferentes.

Por lo tanto, confirmamos en nuestro estudio que el bloqueo del TNF- $\alpha$  produce una modulación de la inflamación no solo a nivel cutáneo, sino también a nivel sistémico. Los inhibidores del TNF- $\alpha$  interfieren en la inmunidad innata, en la respuesta adaptativa Th17/Th22 y en la angiogénesis. Sin embargo, al igual que lo observado a nivel cutáneo, persiste cierto grado de inflamación pese al tratamiento, objetivado en nuestra muestra por la persistencia de niveles de IL-22 elevados respecto a controles.

Además de su acción pro-inflamatoria, TNF- $\alpha$  es una molécula clave en la defensa frente a infecciones y en la homeostasis de la respuesta inmune. En consecuencia, no resulta extraño que el uso de fármacos que bloquean TNF- $\alpha$  se acompañe de un incremento de susceptibilidad a infecciones, incluyendo tuberculosis.<sup>193, 194</sup> Tampoco lo es que su uso, a corto o medio plazo, pudiera ejercer efectos inmunomoduladores que, en el caso de las enfermedades

inflamatorias crónicas como la psoriasis, podrían ser sinérgicos con el efecto antiinflamatorio y, por ello, relevantes en la historia natural de la enfermedad.

Hay pocos estudios que aborden el efecto directo de los fármacos anti-TNF sobre las distintas poblaciones de linfocitos en pacientes con psoriasis.<sup>195</sup> Este fue otro de los objetivos inicialmente planteados en este trabajo, valorar si además de su conocida y potente acción antiinflamatoria, los fármacos anti-TNF podían también ejercer un efecto inmunomodulador a largo plazo, que pudiese conferirles ventajas frente a otros fármacos y quizás modificar la historia natural de una enfermedad crónica como la psoriasis. Incluso cabría la posibilidad de que, puesto que los mecanismos de actuación de los diferentes fármacos anti-TNF no son idénticos, pudiesen ejercer un efecto diferente sobre las diferentes poblaciones de linfocitos. En nuestro estudio no observamos diferencias en las diferentes poblaciones de linfocitos en sangre periférica entre controles y pacientes con psoriasis a nivel basal, excepto un incremento de linfocitos B. Tras el tratamiento, no se observaron modificaciones en las poblaciones de linfocitos B, linfocitos NK y linfocitos T totales (CD3), pero sí un aumento de linfocitos T CD4+.

En los últimos años los linfocitos Treg han emergido como una población de especial interés en las enfermedades autoinmunes e inmunomediadas, siendo una población de difícil caracterización fenotípica y funcional, y cuyo descenso se ha relacionado con un riesgo aumentado para el desarrollo de enfermedades autoinmunes.<sup>196-198</sup> También en psoriasis dos grupos de trabajo independientes, han observado disminución de los linfocitos Treg respecto a controles.<sup>67, 199, 200</sup> Sin embargo, en nuestra serie de pacientes, no observamos diferencias a nivel basal entre pacientes y controles. No obstante, dada la gran

variabilidad interindividual en sujetos sanos en los valores de Treg, creemos que el valor relevante desde un punto de vista patogénico es el comportamiento de esta población en un mismo individuo. Tras el tratamiento, los niveles relativos de Treg aumentaron, lo que podría sugerir que el bloqueo de TNF- $\alpha$  podría favorecer la diferenciación de linfocitos T a poblaciones reguladoras Treg y bloquear la diferenciación a otras células efectoras proinflamatorias Th1 o Th17 patogénicas. Es interesante destacar que el aumento de Treg se produjo en el subgrupo de pacientes tratados con anticuerpos monoclonales, pero no en los tratados con etanercept. Si estos datos se confirman en otros estudios podrían indicar un mecanismo de acción diferente en la diferenciación de los linfocitos T entre anticuerpos monoclonales y proteína de fusión. Es interesante mencionar además que en la práctica totalidad de pacientes en los que aumentaron Treg se observó un descenso de IL-22. No obstante, la significación clínica de este aumento de Treg en 15 de 20 pacientes tratados, es incierta pues en este estudio no se observó correlación significativa entre el número de Treg y el PASI.

Puesto que la población de Treg actúa sobre los linfocitos T activados autorreactivos de forma paracrina, y adquieren su función supresora localmente, es posible que la presencia a nivel local de otras citoquinas proinflamatorias comprometa la eficiencia supresora de los Treg. Así, se ha demostrado en un modelo *in vitro* que IL-6 es suficiente para revertir la actividad supresora de los Treg.<sup>201</sup> Igualmente el perfil de citoquinas presente tiene implicaciones importantes en la inducción de tolerancia pudiendo favorecer la diferenciación a Treg o la generación de células Th17 proinflamatorias.<sup>202</sup> Por lo tanto la verdadera relevancia de la población Treg

como supresora de las poblaciones autorreactivas Th17 y Th22, vendría dada por su función, y no exclusivamente por el número absoluto o relativo de células.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Los fármacos anti-TNF fueron eficaces clínicamente (PASI-75) en el 75% (15/20) de los pacientes con psoriasis en placas refractaria a tratamientos convencionales. A las 16 semanas de tratamiento, la respuesta clínica fue ligeramente superior con los anticuerpos monoclonales, pero no estadísticamente significativa.
2. Los resultados sugieren que en pacientes con psoriasis moderada/grave en tratamiento con anti-TNF es mejor la terapia continua o al menos prolongada en el tiempo.
3. Confirmamos la elevada prevalencia de HLA-Cw6 en pacientes con psoriasis que, sin embargo, no se asoció con infección estreptocócica.
4. A nivel plasmático los pacientes presentaron un incremento en los niveles de IL-8, VEGF e IL-22, que disminuyeron tras tratamiento con anti-TNF.
5. La determinación de los niveles séricos de IL-22, podría ser útil como marcador de inflamación más sensible que los marcadores clásicos (PCR y SAA), por su capacidad para reproducir la actividad inflamatoria en las fases activas de la enfermedad y disminuir sus niveles tras el tratamiento de forma paralela al PASI.
6. En base a la expresión aumentada a nivel cutáneo, las citoquinas que podrían ser relevantes patogénicamente en la piel de los pacientes psoriásicos son TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22.
7. El tratamiento con inhibidores del TNF- $\alpha$  disminuyó la expresión cutánea de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22, que no correlacionó con una

disminución paralela de los niveles plasmáticos de dichas citoquinas. Solo el comportamiento de IL-22 ha sido paralelo en piel y suero.

8. Los inhibidores del TNF- $\alpha$ , producen un aumento de la población de linfocitos T reguladores. Asumiendo que su principal función es controlar la acción de las poblaciones Th1, Th17 y Th22, el aumento de los linfocitos T reguladores justificaría en parte la disminución de las citoquinas inflamatorias que hemos observado tras el tratamiento. Sin embargo, su aumento no se correlacionó con el PASI.

9. Cuando se compararon los efectos inmunológicos entre pacientes tratados con anticuerpos monoclonales y etanercept, se observaron algunas diferencias (niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , inducción de linfocitos T reguladores) que sugieren que los mecanismos de acción no son completamente superponibles.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):535-46.
2. Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun* 2010; 34(3):J314-21.
3. Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26(4):314-20.
4. Naldi L, Gambini D. The clinical spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):510-8.
5. Basavaraj KH, Navya MA, Rashmi R. Stress and quality of life in psoriasis: an update. *Int J Dermatol* 2011; 50(7):783-92.
6. Sander HM, Morris LF, Phillips CM, Harrison PE, Menter A. The annual cost of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28(3):422-5.
7. Dauden E, Castaneda S, Suarez C, Garcia-Campayo J, Blasco AJ, Aguilar MD, et al. Integrated approach to comorbidity in patients with psoriasis. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103 (Suppl 1):1-64.
8. Lopez-Ferrer A, Torrente-Segarra V, Puig L. Psoriatic arthritis: what the dermatologist needs to know, part 1. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101(7):578-84.
9. Murphy M, Kerr P, Grant-Kels JM. The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):524-8.
10. Rahman P, Elder JT. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 (Suppl 2):ii37-9.

11. Cassia FF, Carneiro SC, Marques MT, Pontes LF, Filgueira AL, Porto LC. Psoriasis vulgaris and human leukocyte antigens. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21(3):303-10.
12. Capon F, Burden AD, Trembath RC, Barker JN. Psoriasis and other complex trait dermatoses: from Loci to functional pathways. *J Invest Dermatol* 2012; 132(3 Pt 2):915-22.
13. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H. Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol* 2012; 39(3):231-41.
14. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):563-7.
15. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg* 2010; 29(1):3-9.
16. Wu D, Wu Y, Liu JL, Wang B, Zhang XD. Association between HLA-Cw\*0602 polymorphism and psoriasis risk: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2011; 10(4):3109-20.
17. Mallon E, Bunce M, Savoie H, Rowe A, Newson R, Gotch F, et al. HLA-C and guttate psoriasis. *Br J Dermatol* 2000; 143(6):1177-82.
18. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5):1213-26.
19. Elder JT. Genome-wide association scan yields new insights into the immunopathogenesis of psoriasis. *Genes Immun* 2009; 10(3):201-9.
20. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):606-15.

21. McFadden JP, Baker BS, Powles AV, Fry L. Psoriasis and streptococci: the natural selection of psoriasis revisited. *Br J Dermatol* 2009; 160(5):929-37.
22. Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 2003; 149(3):530-4.
23. Mallbris L, Wolk K, Sanchez F, Stahle M. HLA-Cw\*0602 associates with a twofold higher prevalence of positive streptococcal throat swab at the onset of psoriasis: a case control study. *BMC Dermatol* 2009; 29(9):5.
24. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 1995; 16(3):145-9.
25. Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol* 2009; 30(10):494-501.
26. Buchau AS, Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):616-24.
27. Tschachler E. Psoriasis: the epidermal component. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):589-95.
28. Ghoreschi K, Weigert C, Rocken M. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):574-80.
29. Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol* 2010; 130(2):362-70.
30. Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 2007; 16(10):779-98.

31. Johnson-Huang LM, McNutt NS, Krueger JG, Lowes MA. Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J Clin Immunol* 2009; 29(3):247-56.
32. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol* 2009; 129(2):302-8.
33. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; 449(7162):564-9.
34. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009; 206(9):1983-94.
35. Albanesi C, De Pita O, Girolomoni G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):581-8.
36. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009; 361(5):496-509.
37. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1999; 113(5):752-9.
38. Torti DC, Feldman SR. Interleukin-12, interleukin-23, and psoriasis: current prospects. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57(6):1059-68.

39. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; 129(6):1339-50.
40. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, et al. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 1994; 102(2):145-9.
41. Lew W, Bowcock AM, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol* 2004; 25(6):295-305.
42. Lew W, Lee E, Krueger JG. Psoriasis genomics: analysis of proinflammatory (type 1) gene expression in large plaque (Western) and small plaque (Asian) psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 2004; 150(4):668-76.
43. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 111(4):645-9.
44. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9(6):461-7.
45. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361(9):888-98.
46. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008; 20(11):1361-8.

47. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128(5):1207-11.
48. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2011; 131(3):677-87.
49. Martin DA, Towne JE, Kricorian G, Klekotka P, Gudjonsson JE, Krueger JG, et al. The Emerging Role of IL-17 in the Pathogenesis of Psoriasis: Preclinical and Clinical Findings. *J Invest Dermatol* 2013; 133(1):17-26.
50. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119(12):3573-85.
51. Fujita H, Nograles KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(51):21795-800.
52. Volpe E, Touzot M, Servant N, Marloie-Provost MA, Hupe P, Barillot E, et al. Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* 2009; 114(17):3610-4.
53. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011; 12(5):383-90.

54. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(3):407-15.
55. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(5):523-36.
56. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445(7128):648-51.
57. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 2007; 178(4):2229-40.
58. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008; 159(5):1092-102.
59. Liang SC, Nickerson-Nutter C, Pittman DD, Carrier Y, Goodwin DG, Shields KM, et al. IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol* 2010; 185(9):5531-8.
60. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol* 2011; 23(3):159-63.
61. Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, Boniface K, Juchaux F, Huguier V, et al. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22,

Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J Immunol* 2010; "en prensa".

62. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212( ):8-27.

63. Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* 2006; 212( ):217-37.

64. Andre S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2009; 174(5):1575-87.

65. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 2008; 223( ):371-90.

66. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; 174(1):164-73.

67. Chen L, Shen Z, Wang G, Fan P, Liu Y. Dynamic frequency of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2008; 51(3):200-3.

68. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1701-11.

69. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1693-700.
70. Guttman-Yassky E, Krueger JG. Psoriasis: evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research. *Br J Dermatol* 2007; 157(6):1103-15.
71. Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46(1):1-23; quiz 23-6.
72. Paul C, Gallini A, Maza A, Montaudie H, Sbidian E, Aractingi S, et al. Evidence-based recommendations on conventional systemic treatments in psoriasis: systematic review and expert opinion of a panel of dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25 (Suppl 2):2-11.
73. Sbidian E, Maza A, Montaudie H, Gallini A, Aractingi S, Aubin F, et al. Efficacy and safety of oral retinoids in different psoriasis subtypes: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25 (Suppl 2):28-33.
74. Maza A, Montaudie H, Sbidian E, Gallini A, Aractingi S, Aubin F, et al. Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25 (Suppl 2):19-27.
75. Montaudie H, Sbidian E, Paul C, Maza A, Gallini A, Aractingi S, et al. Methotrexate in psoriasis: a systematic review of treatment modalities, incidence, risk factors and monitoring of liver toxicity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25 (Suppl 2):12-8.

76. Lapolla W, Yentzer BA, Bagel J, Halvorson CR, Feldman SR. A review of phototherapy protocols for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64(5):936-49.
77. Puig L, Carrascosa JM, Carretero G, de la Cueva P, Fatima Lafuente-Urrez R, Belinchon I, et al. Spanish Evidence-Based Guidelines on the Treatment of Psoriasis With Biologic Agents, 2013. Part 1: On Efficacy and Choice of Treatment. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104(8):694-709.
78. Mease P. TNFalpha therapy in psoriatic arthritis and psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(7):755-8.
79. Gottlieb AB. Tumor necrosis factor blockade: mechanism of action. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007; 12(1):1-4.
80. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(2):418-26.
81. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghrayeb J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* 1995; 7(3):251-9.
82. Kohno T, Tam LT, Stevens SR, Louie JS. Binding characteristics of tumor necrosis factor receptor-Fc fusion proteins vs anti-tumor necrosis factor mAbs. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007; 12(1):5-8.
83. Haider AS, Cardinale IR, Whynot JA, Krueger JG. Effects of etanercept are distinct from infliximab in modulating proinflammatory genes in activated human leukocytes. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007; 12(1):9-15.

84. Gottlieb AB, Chamian F, Masud S, Cardinale I, Abello MV, Lowes MA, et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol* 2005; 175(4):2721-9.
85. Tan JK, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Gottlieb AB. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007; 12(1):38-45.
86. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med* 2007; 204(13):3183-94.
87. Griffiths CE, Strober BE, van de Kerkhof P, Ho V, Fidelus-Gort R, Yeilding N, et al. Comparison of ustekinumab and etanercept for moderate-to-severe psoriasis. *N Engl J Med* 2010; 362(2):118-28.
88. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 2012; 366(13):1181-9.
89. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 2012; 366(13):1190-9.
90. Papp KA, Langley RG, Sigurgeirsson B, Abe M, Baker DR, Konno P, et al. Efficacy and safety of secukinumab in the treatment of moderate to severe plaque psoriasis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II dose-ranging study. *Br J Dermatol* 2013; 168(2):412-21.
91. Puig L, Bordas X, Carrascosa JM, Dauden E, Ferrandiz C, Hernanz JM, et al. Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-

severe psoriasis. Spanish psoriasis group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *Actas Dermosifiliogr* 2009; 100(4):277-86.

92. de Vlam K, Gottlieb AB, Fitzgerald O. Biological biomarkers in psoriatic disease. A review. *J Rheumatol* 2008; 35(7):1443-8.

93. Rashmi R, Rao KS, Basavaraj KH. A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34(6):658-63.

94. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 15(2):81-8.

95. Gniadecki R, Kragballe K, Dam TN, Skov L. Comparison of drug survival rates for adalimumab, etanercept and infliximab in patients with psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 2011; 164(5):1091-6.

96. Goedkoop AY, Kraan MC, Picavet DI, de Rie MA, Teunissen MB, Bos JD, et al. Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(4):R326-34.

97. Goedkoop AY, Kraan MC, Teunissen MB, Picavet DI, de Rie MA, Bos JD, et al. Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(7):769-73.

98. Leonardi CL, Powers JL, Matheson RT, Goffe BS, Zitnik R, Wang A, et al. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *N Engl J Med* 2003; 349(21):2014-22.

99. Papp KA, Tying S, Lahfa M, Prinz J, Griffiths CE, Nakanishi AM, et al. A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. *Br J Dermatol* 2005; 152(6):1304-12.
100. van de Kerkhof PC, Segaert S, Lahfa M, Luger TA, Karolyi Z, Kaszuba A, et al. Once weekly administration of etanercept 50 mg is efficacious and well tolerated in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial with open-label extension. *Br J Dermatol* 2008; 159(5):1177-85.
101. Gordon KB, Langley RG, Leonardi C, Toth D, Menter MA, Kang S, et al. Clinical response to adalimumab treatment in patients with moderate to severe psoriasis: double-blind, randomized controlled trial and open-label extension study. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55(4):598-606.
102. Menter A, Tying SK, Gordon K, Kimball AB, Leonardi CL, Langley RG, et al. Adalimumab therapy for moderate to severe psoriasis: A randomized, controlled phase III trial. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58(1):106-15.
103. Saurat JH, Stingl G, Dubertret L, Papp K, Langley RG, Ortonne JP, et al. Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (CHAMPION). *Br J Dermatol* 2008; 158(3):558-66.
104. Thaci D, Ortonne JP, Chimenti S, Ghislain PD, Arenberger P, Kragballe K, et al. A phase IIIb, multicentre, randomized, double-blind, vehicle-controlled study of the efficacy and safety of adalimumab with and without calcipotriol/betamethasone topical treatment in patients with moderate to severe psoriasis: the BELIEVE study. *Br J Dermatol* 2010; 163(2):402-11.

105. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 2001; 357(9271):1842-7.
106. Gottlieb AB, Chaudhari U, Mulcahy LD, Li S, Dooley LT, Baker DG. Infliximab monotherapy provides rapid and sustained benefit for plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(6):829-35.
107. Gottlieb AB, Evans R, Li S, Dooley LT, Guzzo CA, Baker D, et al. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51(4):534-42.
108. Reich K, Nestle FO, Papp K, Ortonne JP, Evans R, Guzzo C, et al. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet* 2005; 366(9494):1367-74.
109. Reich K, Burden AD, Eaton JN, Hawkins NS. Efficacy of biologics in the treatment of moderate to severe psoriasis: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Dermatol* 2012; 166(1):179-88.
110. Kim IH, West CE, Kwatra SG, Feldman SR, O'Neill JL. Comparative efficacy of biologics in psoriasis: a review. *Am J Clin Dermatol* 2012; 13(6):365-74.
111. Bansback N, Sizto S, Sun H, Feldman S, Willian MK, Anis A. Efficacy of systemic treatments for moderate to severe plaque psoriasis: systematic review and meta-analysis. *Dermatology* 2009; 219(3):209-18.
112. Brimhall AK, King LN, Licciardone JC, Jacobe H, Menter A. Safety and efficacy of alefacept, efalizumab, etanercept and infliximab in treating moderate

to severe plaque psoriasis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Dermatol* 2008; 159(2):274-85.

113. Schmitt J, Zhang Z, Wozel G, Meurer M, Kirch W. Efficacy and tolerability of biologic and nonbiologic systemic treatments for moderate-to-severe psoriasis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Dermatol* 2008; 159(3):513-26.

114. Warren RB, Brown BC, Lavery D, Ashcroft DM, Griffiths CE. Biologic therapies for psoriasis: practical experience in a U.K. tertiary referral centre. *Br J Dermatol* 2009; 160(1):162-9.

115. Warren RB, Brown BC, Lavery D, Griffiths CE. Adalimumab for psoriasis: practical experience in a U.K. tertiary referral centre. *Br J Dermatol* 2010; 163(4):859-62.

116. Van Lumig PP, Driessen RJ, Boezeman JB, Van De Kerkhof PC, De Jong EM. Long-term efficacy of etanercept for psoriasis in daily practice. *Br J Dermatol* 2012; 166(2):445-7.

117. Zaragoza V, Perez A, Sanchez JL, Oliver V, Martinez L, Alegre V. Long-term safety and efficacy of etanercept in the treatment of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101(1):47-53.

118. van Lumig PP, van de Kerkhof PC, Boezeman JB, Driessen RJ, de Jong EM. Adalimumab therapy for psoriasis in real-world practice: efficacy, safety and results in biologic-naive vs. non-naive patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27(5):593-600.

119. Pitarch G, Sanchez-Carazo JL, Mahiques L, Perez-Ferriols MA, Fortea JM. Treatment of psoriasis with adalimumab. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32(1):18-22.

120. Sola-Ortigosa J, Sanchez-Regana M, Umbert-Millet P. Efficacy of adalimumab in the treatment of psoriasis: a retrospective study of 15 patients in daily practice. *J Dermatolog Treat* 2012; 23(3):203-7.
121. Driessen RJ, Boezeman JB, van de Kerkhof PC, de Jong EM. Three-year registry data on biological treatment for psoriasis: the influence of patient characteristics on treatment outcome. *Br J Dermatol* 2009; 160(3):670-5.
122. Driessen RJ, Berends MA, Boezeman JB, van de Kerkhof PC, de Jong EM. Psoriasis treatment with etanercept and efalizumab: clinical strategies influencing treatment outcome. *Br J Dermatol* 2008; 158(5):1098-106.
123. Sterry W, Ortonne JP, Kirkham B, Brocq O, Robertson D, Pedersen RD, et al. Comparison of two etanercept regimens for treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: PRESTA randomised double blind multicentre trial. *BMJ* 2010; 340( ):c147.
124. Paul C, van de Kerkhof P, Puig L, Unnebrink K, Goldblum O, Thaci D. Influence of psoriatic arthritis on the efficacy of adalimumab and on the treatment response of other markers of psoriasis burden: subanalysis of the BELIEVE study. *Eur J Dermatol* 2012; 22(6):762-9.
125. Ryan C, Kirby B, Collins P, Rogers S. Adalimumab treatment for severe recalcitrant chronic plaque psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34(7):784-8.
126. Wolfe F, Michaud K, Dewitt EM. Why results of clinical trials and observational studies of antitumour necrosis factor (anti-TNF) therapy differ: methodological and interpretive issues. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (Suppl 2):ii13-ii17.

127. Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, et al. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res* 2011; 303(1):1-10.
128. Krueger GG, Elewski B, Papp K, Wang A, Zitnik R, Jahreis A. Patients with psoriasis respond to continuous open-label etanercept treatment after initial incomplete response in a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3 Suppl 2):S112-9.
129. Papp KA, Poulin Y, Bissonnette R, Bourcier M, Toth D, Rosoph L, et al. Assessment of the long-term safety and effectiveness of etanercept for the treatment of psoriasis in an adult population. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66(2):e33-45.
130. Tying S, Gordon KB, Poulin Y, Langley RG, Gottlieb AB, Dunn M, et al. Long-term safety and efficacy of 50 mg of etanercept twice weekly in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 2007; 143(6):719-26.
131. Gordon K, Papp K, Poulin Y, Gu Y, Rozzo S, Sasso EH. Long-term efficacy and safety of adalimumab in patients with moderate to severe psoriasis treated continuously over 3 years: results from an open-label extension study for patients from REVEAL. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66(2):241-51.
132. Carrascosa JM. Immunogenicity in Biologic Therapy: Implications for Dermatology. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104(6):471-79.
133. Rivera R, Herranz P, Vanaclocha F. Clinical significance of immunogenicity in biologic therapy. *Actas Dermosifiliogr* 2014; 105(1):1-4.
134. De Simone C, Amerio P, Amoruso G, Bardazzi F, Campanati A, Conti A, et al. Immunogenicity of anti-TNFalpha therapy in psoriasis: a clinical issue? *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(12):1673-82.

135. Jamnitski A, Bartelds GM, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, van Schaardenburg D, Stapel SO, et al. The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(2):284-8.
136. Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Garcia-Carazo S, Lojo L, Nuno L, Villalba A, et al. The immunogenicity to the first anti-TNF therapy determines the outcome of switching to a second anti-TNF in spondyloarthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(4):R79.
137. Menter A, Feldman SR, Weinstein GD, Papp K, Evans R, Guzzo C, et al. A randomized comparison of continuous vs. intermittent infliximab maintenance regimens over 1 year in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(1):31 e1-15.
138. Reich K, Wozel G, Zheng H, van Hoogstraten HJ, Flint L. Efficacy and Safety of Infliximab as Continuous or Intermittent Therapy in Patients With Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis: Results of a Randomised, Long-Term Extension Trial (RESTORE2). *Br J Dermatol* 2013; 168(6):1325-34.
139. Moore A, Gordon KB, Kang S, Gottlieb A, Freundlich B, Xia HA, et al. A randomized, open-label trial of continuous versus interrupted etanercept therapy in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(4):598-603.
140. Ortonne J, Griffiths C, Daudén E, Strohal R, Robertson D, Pedersen R, et al. Efficacy and safety of continuous versus paused etanercept treatment in patients with moderate-to-severe psoriasis over 54 weeks: the CRYSTEL study. *Expert Rev Dermatol* 2008; 3(6):657-65.
141. Dauden E, Griffiths CE, Ortonne JP, Kragballe K, Molta CT, Robertson D, et al. Improvements in patient-reported outcomes in moderate-to-severe

psoriasis patients receiving continuous or paused etanercept treatment over 54 weeks: the CRYSTEL study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(12):1374-82.

142. Gordon KB, Gottlieb AB, Leonardi CL, Elewski BE, Wang A, Jahreis A, et al. Clinical response in psoriasis patients discontinued from and then reinitiated on etanercept therapy. *J Dermatolog Treat* 2006; 17(1):9-17.

143. Ortonne JP, Taieb A, Ormerod AD, Robertson D, Foehl J, Pedersen R, et al. Patients with moderate-to-severe psoriasis recapture clinical response during re-treatment with etanercept. *Br J Dermatol* 2009; 161(5):1190-5.

144. Papp K, Menter A, Poulin Y, Gu Y, Sasso EH. Long-term outcomes of interruption and retreatment vs. continuous therapy with adalimumab for psoriasis: subanalysis of REVEAL and the open-label extension study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27(5):634-42.

145. Papp K, Crowley J, Ortonne JP, Leu J, Okun M, Gupta SR, et al. Adalimumab for moderate to severe chronic plaque psoriasis: efficacy and safety of retreatment and disease recurrence following withdrawal from therapy. *Br J Dermatol* 2011; 164(2):434-41.

146. Villanova F, Di Meglio P, Nestle FO. Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 (Suppl 2):ii104-10.

147. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes Immun* 2007; 8(1):1-12.

148. Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. Superantigens in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64(3):455-72.

149. Johnson-Huang LM, Lowes MA, Krueger JG. Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies. *Dis Model Mech* 2012; 5(4):423-33.
150. Zaba LC, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Nograles KE, Guttman-Yassky E, Cardinale I, et al. Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(5):1022-10 e1-395.
151. Bose F, Raeli L, Garutti C, Frigerio E, Cozzi A, Crimi M, et al. Dual role of anti-TNF therapy: enhancement of TCR-mediated T cell activation in peripheral blood and inhibition of inflammation in target tissues. *Clin Immunol* 2011; 139(2):164-76.
152. Johansen C, Vinter H, Soegaard-Madsen L, Olsen LR, Steiniche T, Iversen L, et al. Preferential inhibition of the mRNA expression of p38 mitogen-activated protein kinase regulated cytokines in psoriatic skin by anti-TNFalpha therapy. *Br J Dermatol* 2010; 163(6):1194-204.
153. Markham T, Mullan R, Golden-Mason L, Rogers S, Bresnihan B, Fitzgerald O, et al. Resolution of endothelial activation and down-regulation of Tie2 receptor in psoriatic skin after infliximab therapy. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(6):1003-12.
154. Cordiali-Fei P, Trento E, D'Agosto G, Bordignon V, Mussi A, Ardigo M, et al. Decreased levels of metalloproteinase-9 and angiogenic factors in skin lesions of patients with psoriatic arthritis after therapy with anti-TNF-alpha. *J Autoimmune Dis* 2006; 3( ):5.
155. Campanati A, Goteri G, Simonetti O, Ganzetti G, Giuliadori K, Giuliano A, et al. Angiogenesis in psoriatic skin and its modifications after administration of

etanercept: videocapillaroscopic, histological and immunohistochemical evaluation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22(2):371-7.

156. Gottlieb AB, Masud S, Ramamurthi R, Abdulghani A, Romano P, Chaudhari U, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic response to anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody (infliximab) treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(1):68-75.

157. Clark RA. Gone but not forgotten: lesional memory in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 2011; 131(2):283-5.

158. Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Lowes MA, Krueger JG. Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes. *J Invest Dermatol* 2011; 131(2):391-400.

159. Kimball AB, Gladman D, Gelfand JM, Gordon K, Horn EJ, Korman NJ, et al. National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities and recommendations for screening. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58(6):1031-42.

160. Davidovici BB, Sattar N, Prinz J, Puig L, Emery P, Barker JN, et al. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J Invest Dermatol* 2010; 130(7):1785-96.

161. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA* 2006; 296(14):1735-41.

162. Boehncke WH, Boehncke S, Tobin AM, Kirby B. The 'psoriatic march': a concept of how severe psoriasis may drive cardiovascular comorbidity. *Exp Dermatol* 2011; 20(4):303-7.

163. Wang Y, Gao H, Loyd CM, Fu W, Diaconu D, Liu S, et al. Chronic skin-specific inflammation promotes vascular inflammation and thrombosis. *J Invest Dermatol* 2012; 132(8):2067-75.
164. Golden JB, McCormick TS, Ward NL. IL-17 in psoriasis: implications for therapy and cardiovascular co-morbidities. *Cytokine* 2013; 62(2):195-201.
165. Fabbrini E, Cella M, McCartney SA, Fuchs A, Abumrad NA, Pietka TA, et al. Association Between Specific Adipose Tissue CD4(+) T-Cell Populations and Insulin Resistance in Obese Individuals. *Gastroenterology* 2013; 145(2):366-74 e3.
166. Suarez-Farinas M, Li K, Fuentes-Duculan J, Hayden K, Brodmerkel C, Krueger JG. Expanding the Psoriasis Disease Profile: Interrogation of the Skin and Serum of Patients with Moderate-to-Severe Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2012; 132(11):2552-64.
167. Veale DJ, Ritchlin C, FitzGerald O. Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 (Suppl 2):ii26-9.
168. Ciocon DH, Kimball AB. Psoriasis and psoriatic arthritis: separate or one and the same? *Br J Dermatol* 2007; 157(5):850-60.
169. Armstrong AW, Brezinski EA, Follansbee MR, Armstrong EJ. Effects of Biologic Agents and Other Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Cardiovascular Outcomes in Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Systematic Review. *Curr Pharm Des* 2014; 20(4):500-12.
170. Jokai H, Szakonyi J, Kontar O, Marschalko M, Szalai K, Karpati S, et al. Impact of effective tumor necrosis factor-alfa inhibitor treatment on arterial intima-media thickness in psoriasis: Results of a pilot study. *J Am Acad Dermatol* 2013; 69(4):523-29.

171. Wu JJ, Poon KY, Channual JC, Shen AY. Association between tumor necrosis factor inhibitor therapy and myocardial infarction risk in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 2012; 148(11):1244-50.
172. Griffiths CE, Iaccarino L, Naldi L, Olivieri I, Pipitone N, Salvarani C, et al. Psoriasis and psoriatic arthritis: immunological aspects and therapeutic guidelines. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24(1 Suppl 40):S72-8.
173. Reich K. The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26 (Suppl 2):3-11.
174. Enerback C. Soluble biomarkers in psoriasis. *Eur J Dermatol* 2011; 21(6):844-50.
175. Chodorowska G, Wojnowska D, Juskiewicz-Borowiec M. C-reactive protein and alpha2-macroglobulin plasma activity in medium-severe and severe psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18(2):180-3.
176. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 2004; 150(5):917-28.
177. Sergeant A, Makrygeorgou A, Chan WC, Thorrat A, Burden D. C-reactive protein in psoriasis. *Br J Dermatol* 2008; 158(2):417-9.
178. Ohtsuka T. The relation between high-sensitivity C-reactive protein and maximum body mass index in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2008; 158(5):1141-3.
179. Choudhury RP, Leyva F. C-Reactive protein, serum amyloid A protein, and coronary events. *Circulation* 1999; 100(15):e65-6.

180. Strober B, Teller C, Yamauchi P, Miller JL, Hooper M, Yang YC, et al. Effects of etanercept on C-reactive protein levels in psoriasis and psoriatic arthritis. *Br J Dermatol* 2008; 159(2):322-30.
181. Kanelleas A, Liapi C, Katoulis A, Stavropoulos P, Avgerinou G, Georgala S, et al. The role of inflammatory markers in assessing disease severity and response to treatment in patients with psoriasis treated with etanercept. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36(8):845-50.
182. Boehncke S, Salgo R, Garbaraviciene J, Beschmann H, Hardt K, Diehl S, et al. Effective continuous systemic therapy of severe plaque-type psoriasis is accompanied by amelioration of biomarkers of cardiovascular risk: results of a prospective longitudinal observational study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25(10):1187-93.
183. Dogan S, Atakan N. Is serum amyloid A protein a better indicator of inflammation in severe psoriasis? *Br J Dermatol* 2010; 163(4):895-6.
184. Cordiali-Fei P, Ardigo M, Mastroianni A, Giuliani A, G DA, Bordignon V, et al. Serum cytokines and biomolecular immunological characterization of psoriatic patients in long term etanercept treatment. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21(3):643-9.
185. Mastroianni A, Minutilli E, Mussi A, Bordignon V, Trento E, D'Agosto G, et al. Cytokine profiles during infliximab monotherapy in psoriatic arthritis. *Br J Dermatol* 2005; 153(3):531-6.
186. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5):1373-83.

187. Caproni M, Antiga E, Melani L, Volpi W, Del Bianco E, Fabbri P. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J Clin Immunol* 2009; 29(2):210-4.
188. Dowlatshahi EA, van der Voort EA, Arends LR, Nijsten T. Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 2013; 169(2):266-82.
189. Fitzgerald O, Chandran V. Update on biomarkers in psoriatic arthritis: a report from the GRAPPA 2010 annual meeting. *J Rheumatol* 2012; 39(2):427-30.
190. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; 163(3):1521-8.
191. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008; 112(10):3959-64.
192. Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 2008; 58(2 Suppl):S92-S101.
193. Wallis RS. Biologics and infections: lessons from tumor necrosis factor blocking agents. *Infect Dis Clin North Am* 2011; 25(4):895-910.

194. Hernandez C, Cetner AS, Jordan JE, Puangsuwan SN, Robinson JK. Tuberculosis in the age of biologic therapy. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59(3):363-80; quiz 82-4.
195. Mahiques L, Pitarch G, Sanchez-Carazo JL, Perez-Ferriols A, Soriano CJ, Alegre V. Analysis of lymphocyte populations in psoriatic plaques following inhibition of tumor necrosis factor alpha with etanercept. *Actas Dermosifiliogr* 2007; 98(8):539-44.
196. Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2008; 158(6):1256-63.
197. Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, et al. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 2008; 223( ):391-421.
198. Vandembark AA, Offner H. Critical evaluation of regulatory T cells in autoimmunity: are the most potent regulatory specificities being ignored? *Immunology* 2008; 125(1):1-13.
199. Quaglino P, Ortoncelli M, Comessatti A, Ponti R, Novelli M, Bergallo M, et al. Circulating CD4+CD25 bright FOXP3+ T cells are up-regulated by biological therapies and correlate with the clinical response in psoriasis patients. *Dermatology* 2009; 219(3):250-8.
200. Quaglino P, Bergallo M, Ponti R, Barberio E, Cicchelli S, Buffa E, et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. *Dermatology* 2011; 223(1):57-67.

201. Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol* 2009; 183(5):3170-6.
202. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008; 453(7192):236-40.