

MODULACION FARMACOLOGICA
Y DIETETICA DEL METABOLISMO
DEL ACIDO ARAQUTDONICO.
IMPLICACIONES
EN LA PSORIASIS.

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

Facultad de Medicina

MODULACION FARMACOLOGICA Y DIETETICA DEL
METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO.
IMPLICACIONES EN LA PSORIASIS.

Memoria del trabajo realizado por Lluís Puig i Sanz para optar al grado de Doctor en Medicina bajo la dirección del Profesor José M. de Moragas, Director del Servei de Dermatologia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

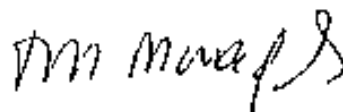


D. JOSE M. DE MORAGAS VIÑAS, Profesor Titular de Dermatología de
la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada "Modulación farmacológica y dietética del metabolismo del ácido araquidónico. Implicaciones en la psoriasis", de la que es autor D. Lluís Puig i Sanz, ha sido realizada bajo mi dirección y se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida ante el tribunal calificador.

Y para que conste, firma el presente certificado en Barcelona a 19
de Noviembre de 1990.



Edo. Dr. J.M. de Moragas



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido a hacer posible la realización de este trabajo:

Al Profesor José M^o de Noragas, a quien debo mi formación en Dermatología, que desde la Jefatura del Servicio de Dermatología del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo, ha venido alentado en todo momento el afán investigador de quienes con él trabajamos, posibilitó el desarrollo de la Línea de Investigación en Dermatología experimental de la F.I.S.P., puso a mi disposición los medios necesarios para la realización del presente estudio y ha dirigido esta tesis, que no hubiera podido llegar a término sin su ayuda, ideas y orientación.

Al Doctor Ferran Solduga, ex-Director del Servicio de Dermatología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, que compartió conmigo durante años su experiencia clínica, por la confianza que supo poner en sus colaboradores y por su valía humana.

Al Dr. Lluís Vila, Jefe del Departament de Nitjadors de la Inflamació i Proliferació Cel·lular de la Fundació d'Investigació Sant Pau, por su amistad, asesoramiento científico y estrecha colaboración, que fueron esenciales para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Conxita de Castellarnau, Jefe de Departamento de la Fundació d'Investigació Sant Pau, por su continuado apoyo desde las fases iniciales de mi colaboración con la Unitat de Recerca Biomèdica de la Fundació d'Investigació Sant Pau, y a todos los investigadores y técnicos del mismo, en especial a Cristina Gibert, Nuria Godessart y Josep Solá, sin cuya inestimable ayuda y dedicación no hubiera podido completarse este trabajo.

A la Comisión Asesora en Ciencia y Tecnología, por la concesión de la Beca CAICYT 1986 No. PA 85/0242, para la financiación del proyecto "Papel del metabolismo del ácido araquidónico y su modulación en la fisiopatología de la psoriasis", que fue la base de la presente tesis y permitió su desarrollo.

A los responsables de todas las industrias farmacéuticas que contribuyeron a la realización del presente trabajo, proporcionando gentilmente los fármacos empleados en cada uno de los estudios.

A los compañeros y amigos del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que me ofrecieron su comprensión y apoyo durante el desarrollo de esta tesis, y a todos aquellos que de un modo u otro han contribuido a la realización de la misma.

A Maite, por su apoyo, comprensión y ayuda durante todo el proceso de elaboración de esta tesis, y por muchas otras cosas.

A MIS PADRES

A MAITE

INDICE .

ABREVIATURAS.	vi
1. INTRODUCCION.	1
1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS Y ASPECTOS CLINICOS.	4
1.2 HISTOPATOLOGIA.	6
1.3 ETIOPATOGENIA.	9
1.3.1. COMPONENTES CELULARES.	11
1.3.1.1. QUERATINOCITOS	12
1.3.1.2. FIBROBLASTOS	15
1.3.1.3. VASCULATURA DERMICA	16
1.3.1.4. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES	16
1.3.1.5. CELULAS INMUNOCOMPETENTES	17
1.3.2. MEDIADORES INTERCELULARES.	19
1.3.2.1. PEPTIDOS: FACTORES DE CRECIMIENTO, CITOCINAS, FACTORES DEL COMPLEMENTO.	19
1.3.2.1.1. FACTORES DE CRECIMIENTO.	19
1.3.2.1.2. INTERLEUCINAS.	21
1.3.2.1.3. INTERFERONES.	22
1.3.2.1.4. FACTORES DEL COMPLEMENTO.	23
1.3.2.4. LIPIDOS: RICOSANOIDES, PROSTANOIDES Y PAF	23
1.3.3. MEDIADORES INTRACELULARES.	26
1.3.3.1. SISTEMAS DE ACOPLAMIENTO. CINASAS.	26
1.3.3.1.1. PROTEIN-CINASA A.	27
1.3.3.1.2. TIROSINA-CINASA.	27
1.3.3.1.3. PROTEIN-CINASA C.	28
1.3.3.1.4. PROTEIN-CINASAS G.	30

1.3.3.1.5.	FOSFATIDILINOSITOL-CINASA.	31
1.3.3.1.6.	CALMODULINA-CINASA.	32
1.3.3.2.	REGULACION INTRACELULAR. SEGUNDOS MENSAJEROS. . .	32
1.3.3.2.1.	AMP CICLICO Y GMP CICLICO.	33
1.3.3.2.2.	MEDIADORES DERIVADOS DE LA ACCION DE LAS FOSFO- LIPASAS SOBRE LOS FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA. .	34
1.3.3.2.3.	CA ²⁺	36
1.3.4.	HIPOTESIS UNITARIA.	37
1.4.	BIOQUIMICA DE LOS EICOSANOIDES.	40
1.4.1.	LIBERACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO.	42
1.4.2.	METABOLIZACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO	46
1.4.2.1.	CICLOOXIGENASA.	46
1.4.2.2.	LIPOXIGENASAS.	50
1.5.	EVIDENCIAS DEL PAPEL FISIOPATOGENICO DE LOS EICOSANOIDES EN LA PSORIASIS	53
1.6	NIVELES ELEVADOS DE EICOSANOIDES EN LAS LESIONES DE PSORIASIS.	53
1.7.	METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LOS COMPONENTES CELULARES PRESENTES EN LA PIEL NORMAL Y EN LAS LESIONES DE PSORIASIS.	55
1.7.1.	QUERATINOCITOS.	55
1.7.2.	FIBROBLASTOS.	58
1.7.3.	LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.	59
1.7.4.	PLAQUETAS.	63
1.8.	EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS EICOSANOIDES DE INTERÉS DERMATOLÓGICO E IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA PSORIASIS.	64
1.8.1.	EFFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LA PIEL HUMANA. .	65
1.8.2.	EFFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LOS POLIMOR- FONUCLEARES HUMANOS.	69

1.8.3.	EFFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LOS QUERATINOCITOS EPIDERMICOS HUMANOS.	70
1.8.4.	EFFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LAS CELULAS INMUNOCOMPETENTES HUMANAS.	71
1.9.	IMPLICACIONES DE LA MODULACION DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR DIVERSOS FARMACOS EFICACES EN EL TRATAMIENTO DE LA PSORIASIS.	73
1.9.1.	ALQUITRANES. DITRANOL.	73
1.9.2.	CORTICOIDES.	74
1.9.3.	NETOTREXATE.	75
1.9.4.	RETINOIDES.	76
1.9.5.	CICLOSPORINA.	76
1.9.6.	FOTOTERAPIA Y FOTOQUIMIOTERAPIA.	77
1.9.7.	ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES.	77
1.9.8.	INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA.	78
1.10	IMPLICACIONES DE LA MODULACION DIETETICA DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN LA PSORIASIS MEDIANTE ACEITE DE PESCADO RICO EN ACIDO EICOSAPENTANOICO.	80
2.	HIPOTESIS DE TRABAJO Y ESTUDIOS PRELIMINARES.	85
2.1.	HIPOTESIS DE TRABAJO	86
2.2	ESTUDIOS PRELIMINARES.	88
2.2.1.	ESTUDIO PRELIMINAR DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS, PLAQUETAS Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES PROCEDENTES DE VOLUNTARIOS SANOS.	88
2.2.2.	ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LAS SUSPENSIONES DE PLAQUETAS PROCEDENTES DE PACIENTES PSORIASICOS Y VOLUNTARIOS SANOS.	97
2.2.3.	ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LAS SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES PROCEDENTES DE PACIENTES PSORIASICOS Y VOLUNTARIOS SANOS.	104
3.	OBJETIVOS	108

4. MATERIAL Y METODOS.	111
4.1. OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.	112
4.1.1. OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.	112
4.1.2. PREPARACION DE SUSPENSIONES DE PLAQUETAS.	112
4.1.3. PREPARACION DE SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.	112
4.1.4. PREPARACION DE SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS.	113
4.1.5. AISLAMIENTO Y PUESTA EN CULTIVO DE FIBROBLASTOS DERMICOS.	114
4.2. ANALISIS DE LIPIDOS EN LAS MUESTRAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).	115
4.3. ESTUDIOS DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN DIVERSOS TIPOS CELULARES.	118
4.3.1. PLAQUETAS.	118
4.3.2. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.	119
4.3.3. SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS.	119
4.3.4. FIBROBLASTOS EN CULTIVO.	120
4.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FARMACOS INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA (PIRIPROST, LONAPALENE) SOBRE OTRAS VIAS DEL ACIDO ARAQUIDONICO ACTIVAS EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS Y DE PLAQUETAS.	120
4.5. IMIDAZOLES	122
4.5.1. EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRIMAZOL Y KETOCONAZOL, SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.	123
4.5.2 EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRIMAZOL Y KETOCONAZOL, SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE PLAQUETAS.	124
4.6. CICLOSPORINA A	124
4.6.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS HUMANAS.	125

4.6.2.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS DERMICOS HUMANOS.	125
4.7.	PROTOCOLO ACIDO EICOSAPENTAENOICO	127
5.	RESULTADOS	134
5.1.	ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FARMACOS INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA (PIRIPROST, LONAPALENE) SOBRE OTRAS VIAS DEL ACIDO ARAQUIDONICO ACTIVAS EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS Y DE PLAQUETAS.	135
5.2.	IMIDAZOLES	144
5.2.1.	EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRINAZOL Y KETOCONAZOL SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLINORFONUCLEARES.	144
5.2.2	EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRINAZOL Y KETOCONAZOL SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE PLAQUETAS.	148
5.3.	CICLOSPORINA A	156
5.3.1.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS HUMANAS.	156
5.3.2.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS DERMICOS HUMANOS.	158
5.4.	PROTOCOLO ACIDO EICOSAPENTAENOICO	163
6.	DISCUSION.	189
6.1	ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FARMACOS INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA (PIRIPROST, LONAPALENE) SOBRE OTRAS VIAS DEL ACIDO ARAQUIDONICO ACTIVAS EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS Y DE PLAQUETAS.	190
6.2.	IMIDAZOLES	198
6.3.	CICLOSPORINA A	206
6.4.	PROTOCOLO ACIDO EICOSAPENTAENOICO	214
7.	CONCLUSIONES.	233
8.	BIBLIOGRAFIA.	239

ABREVIATURAS .

12-HETE:	Acido 12(S)-hidroxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
12-HPETE:	Acido 12(S)-hidroperoxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
13-HODE:	Acido 13-hidroxi-octadecadienoico.
¹⁴ C-AA:	Acido [1- ¹⁴ C]-araquidónico.
15-HEDR:	Acido 15-hidroxi-eicosadienoico.
15-HETE:	Acido 15(S)-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
20-COOH-LTB ₄ :	Acido 5(S),12(R)-dihidroxi-20-carboxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
20-OH-LTB ₄ :	Acido 5(S),12(R),20-trihidroxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
5-HETE:	Acido 5(S)-hidroxi-6,8,11,14-eicosatetraenoico.
5-HPETE:	Acido 5(S)-hidroperoxi-6,8,11,14-eicosatetraenoico.
5,6-DIHETEs:	Acidos 5,6-dihidroxi-7,9,11,14-eicosatetraenoicos.
5S,12S-DIHETE:	Acido 5(S),12(S)-dihidroxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
5S,15S-DIHETE:	Acido 5(S),15(S)-dihidroxi-6,8,11,13-eicosatetraenoico.
6-(trans-12-epi)-LTB ₄ :	Acido 5(S),12(S)-dihidroxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
6-Trans-LTB ₄ :	Acido 5(S),12(R)-dihidroxi-6,8,10,14-eicosatetraenoico.
9-HODE:	Acido 9-hidroxi-octadecadienoico.
AA:	Acido araquidónico
ADP:	Adenosina difosfato
APQ:	Apolipoproteína
ASA:	Aspirina
céls:	Células
DIHETEs:	Acidos dihidroxieicosatetraenoicos.
DHA:	Acido docosahexaenoico.
DMEM:	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium".
EGF:	"Epidermal growth factor".
EPA:	Acido eicosapentaenoico
ETAF:	"Epidermal thymocyte activating factor"
GM-CSF:	"Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"
HETEs:	Acidos hidroxieicosatetraenoicos
HPETEs:	Acidos hidroperoxitetraenoicos
HPLC:	"High performance liquid chromatography", cromatografía líquida de alta resolución.
I1b:	Compuesto de degradación de la PGE ₂ , con un tiempo de retención intermedio entre la PGD ₂ y la PGB ₂ , encontrado en los incubados de queratinocitos y fibroblastos.
IL-1:	Interleucina-1.
IP:	Inositol monofosfato.
IP ₂ :	Inositol difosfato.
IP ₃ :	Inositol trifosfato.
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad.
LTA ₄ :	Leucotrieno A ₄ , ácido 5(S)(6(S))-óxido-(E,E,Z,Z)-7,9,11,14-eicosatetraenoico

LTD ₄ :	Leucotrieno B ₄ , ácido 5(S),12(R)-dihidroxi-6,8,10,-14-eicosatetraenoico.
LTC ₄ :	Leucotrieno C ₄ , ácido 5(S)-hidroxi-6(R)-S-glutamínil-7,9,11,14-eicosatetraenoico.
LTD ₄ :	Leucotrieno D ₄ , ácido 5(S)-hidroxi-6(R)-S-cisteínilglicil-7,9,11,14-eicosatetraenoico.
LTR ₄ :	Leucotrieno E ₄ , ácido 5(S)-hidroxi-6(R)-S-cisteínil-7,9,11,14-eicosatetraenoico.
LTF ₄ :	Leucotrieno F ₄ , ácido 5(S)-hidroxi-6(R)-S-γ-glutamílcisteínil-7,9,11,14-eicosatetraenoico.
LTa:	Leucotrienos.
LXa:	Lipoxinas.
M:	Media.
min:	Minutos.
PAF:	"Platelet activating factor".
PGA ₂ :	Prostaglandina A ₂ .
PGB ₂ :	Prostaglandina B ₂ .
PGD ₂ :	Prostaglandina D ₂ .
PGE ₁ :	Prostaglandina E ₁ .
PGE ₂ :	Prostaglandina E ₂ .
PGF _{1α} :	Prostaglandina F _{1α} .
PGF _{2α} :	Prostaglandina F _{2α} .
PGG ₂ :	Prostaglandina G ₂ , endoperóxido.
PGH ₂ :	Prostaglandina H ₂ , endoperóxido.
PGI ₂ :	Prostaglandina I ₂ , prostaciclina.
PGs:	Prostaglandinas.
PI:	Fosfatidil inositol.
PIP:	Fosfatidil inositol monofosfato.
PIP ₂ :	Fosfatidil inositol difosfato.
PIP ₃ :	Fosfatidil inositol trifosfato.
PMN:	Leucocitos polimorfonucleares.
PPP:	Plasma pobre en plaquetas.
PRP:	Plasma rico en plaquetas.
SBF:	Suero bovino fetal.
SD:	Desviación estándar.
T1:	Desarrollo cromatográfico 1, descrito en el apartado 4.2 del material y métodos.
T2.1:	Desarrollo cromatográfico 2.1, descrito en el apartado 4.2 del material y métodos.
T2:	Desarrollo cromatográfico 2, descrito en el apartado 4.2 del material y métodos.
T3:	Desarrollo cromatográfico 3, descrito en el apartado 4.2 del material y métodos.
TXA ₂ :	Tromboxano A ₂ .
TXB ₂ :	Tromboxano B ₂ .
UV:	Ultravioleta.
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad.

1. INTRODUCCION.

La psoriasis es una de las enfermedades dermatológicas a la que se ha dedicado un mayor esfuerzo de investigación, pese a lo cual nuestros conocimientos del defecto básico y de los mecanismos patogénicos que intervienen en esta enfermedad son limitados.

Muchas de las alteraciones que se han considerado de importancia patogénica en la psoriasis sólo se encuentran en la piel lesional o en relación con el grado de actividad de la enfermedad, cuando cabría esperar que un defecto primario se pudiera encontrar en la piel no afecta de pacientes psoriásicos y en las fases más incipientes de la formación de las lesiones.

Cualquier hipótesis que intente explicar la etiopatogenia de la psoriasis debe tener en cuenta los aspectos genéticos, clínicos e histopatológicos de la misma, ser lo suficientemente general como para abarcar los mecanismos de proliferación, reparación e inflamación que están alterados en la psoriasis, y tener implicaciones terapéuticas que permitan un tratamiento más efectivo, más práctico y con la menor toxicidad posible para el paciente.

Por otra parte, el estudio de los mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación celulares, y su acoplamiento con la respuesta inflamatoria, permite obtener conclusiones generales en el campo de la biología celular, aplicables a diversas situaciones fisiológicas (como por ejemplo la reparación de las heridas) y patológicas (como por ejemplo la proliferación neoplásica).

A continuación se describen desde una perspectiva histórica los principales aspectos clínicos, histopatológicos y etiopatogénicos de la psoriasis, a modo de introducción al estado actual de los conocimientos sobre el papel de los eicosanoides en la fisiopatología de esta enfermedad, que se discuten en otro apartado.

La investigación del papel fisiopatológico de los eicosanoides, en relación con las posibles implicaciones terapéuticas de la modulación farmacológica y dietética de su metabolismo en la psoriasis, constituyen la justificación de la presente tesis.

1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS Y ASPECTOS CLINICOS.

La primera descripción de una dermatosis que se puede reconocer como psoriasis se atribuye a Celso (25 adC- 45 ddC), que la incluye dentro del impétigo en su "De re medica", a principios de nuestra Era. El término "psoriasis" (del griego psora, prurito) fue utilizado por primera vez por Galeno (133-200 ddC), aunque probablemente hacía referencia en su descripción a la dermatitis seborreica. Hipócrates agrupó a la psoriasis entre las dermatosis descamativas (lopoi). La confusión nosológica persistió hasta el siglo XVIII, y los psoriásicos sufrían a menudo el mismo destino que los leprosos [1].

La primera descripción correcta de la psoriasis y sus diversas formas clínicas se debe a Willan, en 1809, aunque no se distinguieron claramente de la lepra hasta 1841, gracias a la autoridad de Hebra. Posteriormente, Auspitz (1835-1886) describió adecuadamente los aspectos histológicos de la psoriasis e introdujo los términos "acantosis" y "paraqueratosis".

Durante el siglo pasado se establecieron la mayoría de las formas clínicas de la psoriasis, tal como las conocemos hoy en día [2]. Radcliffe Crocker en 1903 describía las siguientes variantes clínicas: las lesiones individuales de la psoriasis punctata estaban formadas por pápulas aplanadas puntiformes, que tendían a crecer hasta alcanzar el tamaño de gotas de agua, correspondientes a la psoriasis guttata. El crecimiento progresivo de las lesiones determinaba la denominación de psoriasis nummularia o discoides. Cuando la confluencia de varias placas determinaba la afectación de la mayor parte de una extremidad o del tronco, se aplicaba la denominación de psoriasis diffusa, y cuando era generalizada, se denominaba psoriasis universalis.

La involución de la enfermedad se inicia en el centro de la placa, dando lugar a lesiones anulares correspondientes a la psoriasis circinata. La presencia de lesiones recalcitrantes, con escamas adherentes, fisuración y engrosamiento, se denominaba psoriasis inveterata, y cuando las escamas se disponían formando montículos cónicos, semejantes a valvas de molusco, la variante de la enfermedad se denominaba psoriasis rupiacea.

El fenómeno de Koebner se describió en 1872, y la disposición lineal de las lesiones se conocía como psoriasis striata. Cuando las lesiones se presentaban como placas eritematosas brillantes, de aspecto inflamatorio, finamente desquamativas y con bordes mal definidos, la enfermedad se denominaba psoriasis acuta.

La psoriasis pustulosa generalizada fue descrita por von Zumbusch en 1910, y las formas localizadas, con diversas denominaciones y sutiles diferencias clínicas, por Radcliffe Crocker y Hallopeau, a finales del siglo pasado. En 1930 se inicia una discusión respecto de la situación nosológica de las diversas formas de (psoriasis) pustulosa de localización acral (dermatitis repens de Radcliffe Crocker, acrodermatitis continua de Hallopeau, psoriasis pustulosa de Barber, pustulosis palmoplantar, bacteriide pustulosa de Andrews, etc.), que hasta cierto punto persiste en la actualidad.

A finales del siglo pasado también se conocían perfectamente las características de la onicopatía psoriásica y las posibles variaciones morfológicas de la enfermedad de acuerdo con su localización (palmoplantar, flexural-genital o en cuero cabelludo).

En conclusión, los grandes morfólogos del siglo pasado y el primer tercio del presente habían descrito la práctica totalidad de los aspectos clínicos de la psoriasis, y los avances producidos en los últimos 50 años hacen referencia principalmente a la histopatolo-

gía y al desarrollo de hipótesis fisiopatológicas. A continuación se revisan brevemente estos aspectos por sus implicaciones en relación con los objetivos de la presente tesis.

1.2 HISTOPATOLOGIA.

La imagen histológica clásica de la psoriasis [3-5], con el característico patrón de hiperplasia psoriasiforme, sólo se encuentra en lesiones maduras, correspondientes a placas estables de semanas a meses de evolución. Las lesiones incipientes de psoriasis, especialmente cuando aparecen sobre piel clínicamente normal, tienen un aspecto histológico diferente de las anteriores, y ni siquiera psoriasiforme.

Lesiones incipientes. En la última década se ha estudiado con detalle la evolución histológica de las lesiones psoriásicas, desde su manifestación más incipiente, correspondiente a máculas puntiformes de superficie lisa. En estas lesiones los cambios epidérmicos son mínimos, pero se observa un infiltrado inflamatorio, cuya composición es objeto de debate: para algunos autores el tipo celular predominante son los PMN [6,7], mientras que para otros las fases precoces del infiltrado se caracterizan por un marcado predominio linfomonocitario [8-11].

Recientemente, Brody [12,13] ha descrito detalladamente la evolución de las lesiones incipientes de la psoriasis guttata eruptiva aguda, destacando la desgranulación de los mastocitos presentes en la dermis como uno de los acontecimientos más precoces.

Los primeros estudios de las alteraciones estructurales más precoces en la psoriasis se basaron en la toma de biopsias de lesiones inducidas por traumatismo mecánico (fenómeno de Koebner) [7], lo que proporciona un modelo reproducible de seguimiento evolutivo pero impide la evaluación por separado de los cambios

histológicos propios de la psoriasis de los secundarios al efecto del traumatismo. Posteriormente se ha utilizado un modelo experimental que saca partido del fenómeno de rebote que se produce en las lesiones de psoriasis tratadas con corticoides potentes (propionato de clobetasol bajo oclusión durante unos 6 a 10 días) al suspender el tratamiento [14].

En este modelo, los cambios más precoces se observan en las vénulas poscapilares de la dermis, con alteraciones de las células endoteliales, en forma de hinchazón y aparición de fenestraciones, y aumento en el número de mastocitos, que muestran signos de desgranulación. Al cabo de algunas horas se observan macrófagos activados, que constituyen el primer tipo celular que emigra hacia la dermis. La presencia de macrófagos se asocia a cambios ultraestructurales caracterizados por la presencia de edema intercelular y la desaparición de los complejos de tonofilamentos de los desmosomas, que parecen ser secundarios. La ausencia de alteraciones en los hemidesmosomas y la unión dermoepidérmica contrasta con la intensa afectación de los desmosomas. En una fase más tardía se observa exocitosis de PMN y macrófagos.

Lesiones de psoriasis guttata eruptiva. La evolución de las lesiones de psoriasis guttata eruptiva ha sido estudiada mediante biopsias seriadas en pacientes con recidivas de psoriasis guttata postestreptocócica tras el tratamiento con penicilina [12,13]. Las alteraciones más precoces, presentes en piel clínicamente normal de pacientes con psoriasis de 2 días de evolución, son la desgranulación de los mastocitos, la aparición de fenestraciones e hipertrofia de las células endoteliales en las vénulas poscapilares dérmicas y áreas de espongirosis puntiforme en las zonas adyacentes y suprayacentes. El infiltrado dérmico y la exocitosis de células mononucleares aparecen entre el 5º y el 21º días de evolución en la piel clínicamente normal, y desde el 2º día de evolución en las lesiones clínicamente evidentes, en las que también se observan

alteraciones vasculares más intensas, un infiltrado inflamatorio de células mononucleares con escasos PMN, hiperplasia epidérmica y migración epidérmica de algunos PMN formando microabscesos de Munro en las áreas paraqueratóticas de la capa córnea.

Lesiones de psoriasis guttata completamente desarrolladas. Las lesiones de psoriasis guttata completamente desarrolladas presentan alteraciones dérmicas y epidérmicas suficientes para permitir el diagnóstico histológico de psoriasis [15]. Se produce una migración intermitente de PMN desde las puntas de las papilas hacia la epidermis en las áreas de paraqueratosis, que se desplazan junto con los neutrófilos hacia la superficie de la capa córnea, que determina finalmente la formación de microabscesos de Munro. El carácter intermitente y discontinuo de este fenómeno determina la presencia de montículos de paraqueratosis en el seno de una epidermis ortoqueratótica en su mayor parte. En algunos casos se produce una marcada exocitosis de PMN hacia la epidermis, agregándose en la porción superior de la capa espinosa para dar lugar a la formación de diminutas pústulas espongiiformes de Kogoj. Las alteraciones epidérmicas descritas son inicialmente focales pero ulteriormente confluyen para dar lugar a la formación de una placa de psoriasis.

Lesiones de psoriasis en fase de estado [3-5,15]. A continuación se describen los hallazgos histopatológicos característicos de las lesiones completamente desarrolladas, cuya expresión más significativa se obtiene examinando una biopsia procedente del borde de una placa en fase de crecimiento activo.

Las crestas interpapilares presentan la característica hiperplasia psoriasisiforme, caracterizada por acantosis regular con alargamiento, engrosamiento y tendencia a la confluencia en su porción inferior. Se observa un aumento en el número de mitosis, que no se limitan a la capa basal, sino que se pueden encontrar en las dos

hileras de células suprabasales.

El aspecto de las papilas dérmicas corresponde al de las crestas interpapilares. Contienen capilares dilatados y tortuosos, con un infiltrado perivascular escaso formado habitualmente por células mononucleares, pero en el que se puede observar la presencia de neutrófilos durante las fases de exacerbación.

La capa de Malpighio parece adelgazada, y está formada por células de citoplasma pálido a causa del edema intracelular. Puede observarse exocitosis de neutrófilos en las capas de la epidermis situadas por debajo de las áreas de paraqueratosis de la capa córnea, que da lugar a la formación de las características pústulas espongiiformes de Kogoj.

La capa córnea presenta habitualmente una paraqueratosis confluyente, con la correspondiente ausencia de capa granulosa, alternando con discretos focos de ortoqueratosis. La naturaleza dinámica de las lesiones de psoriasis determina el carácter alternante de los cambios descritos en la capa córnea. Los microabscesos de Munro se localizan en las áreas paraqueratósicas de la capa córnea [15,17] y se caracterizan por la presencia de acúmulos de PMN degenerados procedentes de la migración desde los capilares dilatados de las papilas dérmicas. Cuando las lesiones de psoriasis se cronifican, habitualmente se puede observar un menor número de microabscesos de Munro y un menor grado de paraqueratosis.

1.3 ETIOPATOGENIA.

La psoriasis es una de las enfermedades dermatológicas a la que se ha dedicado un mayor esfuerzo de investigación, pese a lo cual nuestros conocimientos del defecto básico y de los mecanismos patogénicos que intervienen en esta enfermedad son escasos.

Muchas de las alteraciones que se han considerado de importancia patogénica en la psoriasis sólo se encuentran en la piel lesional o en relación con el grado de actividad de la enfermedad, cuando cabría esperar que un defecto primario se pudiera encontrar en la piel no afecta de pacientes psoriásicos y en las fases más incipientes de la formación de las lesiones. Cualquier hipótesis que intente explicar la etiopatogenia de la psoriasis debe tener en cuenta los aspectos genéticos, clínicos e histopatológicos de la misma, ser lo suficientemente general como para abarcar los mecanismos de proliferación, reparación e inflamación que están alterados en la psoriasis, y tener implicaciones terapéuticas que permitan un tratamiento más efectivo, más práctico y con la menor toxicidad posible para el paciente.

Por otra parte, el estudio de los mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación celulares, y su acoplamiento con la respuesta inflamatoria, permite obtener conclusiones generales en el campo de la biología celular, aplicables a diversas situaciones fisiológicas (como por ejemplo la reparación de las heridas) y patológicas (como por ejemplo la proliferación neoplásica).

Un enfoque válido para describir los posibles mecanismos patogénicos en la psoriasis, una enfermedad (o tal vez varias) de etiología desconocida y caracterizada por múltiples alteraciones, consiste en considerar las alteraciones patofisiológicas en tres niveles interrelacionados: así pues, existen alteraciones en los componentes celulares de la piel, que están en compleja interrelación con los mediadores intercelulares e intracelulares de la respuesta celular. En aras de una mayor claridad, se empleará este enfoque para la descripción de los mecanismos patogénicos de la psoriasis.

1.3.1. COMPONENTES CELULARES.

Hace un siglo, los principales elementos histopatológicos de la psoriasis (proliferación epidérmica y cambios inflamatorios) ya se habían descrito adecuadamente, y se había iniciado la discusión sobre cuál es el acontecimiento primario en la fisiopatología de esta enfermedad.

Unna, en su tratado *Histopathology of Skin Diseases*, hacía énfasis en la paraqueratosis, la proliferación epitelial y la dilatación de los vasos sanguíneos de la dermis, y mencionaba la presencia de microorganismos en la capa córnea como un posible factor etiológico en la producción del fenómeno de Koebner [2]. En opinión de Unna, tanto la proliferación epitelial como los cambios inflamatorios contribuían a la fisiopatología de la psoriasis, pero no quedaba claro cuál de ambos fenómenos era primario.

Auspitz consideraba que la elongación de las papilas dérmicas se debía a la proliferación de los queratinocitos en las crestas interpapilares, y opinaba que las alteraciones vasculares eran debidas a la presencia de factores quimiotácticos que dilataban y posteriormente determinaban la elongación de los vasos sanguíneos de la dermis. Este concepto, formulado a finales del siglo pasado, parece muy avanzado para la época y tiene plena vigencia en la actualidad.

Durante la primera mitad del siglo XX se produjeron escasos avances en la comprensión de la fisiopatología de la psoriasis. En 1943, Burke y Montgomery [18] hacían hincapié en la presencia de un elevado número de figuras mitóticas en la capa basal y espinosa de la epidermis, y su normalización con el tratamiento (Goeckerman). Van Scott y Ekel [19] publicaron en 1963 el primer estudio importante de la cinética de los queratinocitos en la psoriasis, describiendo el aumento en el recuento de mitosis por unidad de

longitud y la disminución en el tiempo de recambio celular, que estimaron en 7 veces inferior al de la piel normal. En opinión de los citados autores [19] la hiperplasia epidérmica era secundaria a las alteraciones en la dermis papilar.

Como consecuencia de este trabajo, se establecen dos hipótesis que en gran parte continúan siendo vigentes en la actualidad: que las alteraciones metabólicas y biológicas presentes en los queratinocitos de las placas de psoriasis son secundarias al estado hiperproliferativo de los mismos, y que los fármacos efectivos en la psoriasis deben su acción a un efecto antimitótico. Sin embargo, en otras dermatosis y situaciones experimentales caracterizadas por un estado hiperproliferativo de la epidermis, no se observan las manifestaciones clínicas o histológicas de la psoriasis, y durante el tratamiento de la misma con fármacos citostáticos, la normalización de la capa granulosa antecede a cualquier disminución en el recuento de mitosis [20].

1.3.1.1. QUERATINOCITOS

Durante las décadas de los 60 y los 70, el estudio de la cinética de los queratinocitos en la psoriasis es objeto de especial interés, y se llega a la conclusión de que la existencia de una situación hiperproliferativa es una de las principales alteraciones en la epidermis psoriásica, y que no se encuentra limitada tan solo a la epidermis lesional [21-26].

El trastorno hiperproliferativo de la epidermis en la psoriasis es complejo, pero se puede resumir como sigue [25-27]: en la epidermis psoriásica parecen existir al menos tres defectos proliferativos: una reducción en la duración del ciclo celular de 311 a 36 horas, una duplicación de la población de células proliferativas (en la actualidad se discute si a expensas de las células tronco o del compartimiento de amplificación transitoria), y un aumento en la

fracción de crecimiento (células del compartimiento proliferativo que no se encuentran en fase G₀) del 60 al 100%.

Como consecuencia de esta hiperproliferación, o de forma simultánea a la misma, se producen una serie de alteraciones en la diferenciación, la actividad enzimática y la biología molecular de los queratinocitos, cuyo exacto papel y complejas interacciones no están completamente aclarados en la actualidad [28-30].

Cuando la epidermis psoriásica se compara con la normal, se encuentran alteraciones en la composición de los polipéptidos de queratina [31-34], en diversas actividades proteolíticas [35-40] y en los azúcares conjugados en la membrana celular [41-43], que indican la presencia de un trastorno de diferenciación de los queratinocitos.

Hasta no hace mucho se asumía que en los queratinocitos psoriásicos se producía una interrupción del mismo patrón de maduración que en los normales; la psoriasis se consideraba una dermatosis caracterizada por una hiperproliferación primaria de las células basales [44], con mantenimiento de las características antigénicas de la monocapa basal [45,46]; este trastorno hiperproliferativo determinaría un aumento en el recambio celular de la epidermis y un trastorno (interrupción) del patrón de maduración normal. Recientemente se han obtenido evidencias de que existe una alteración cualitativa, y no simplemente un bloqueo, en el patrón de maduración de los queratinocitos en las lesiones activas de psoriasis [34,47-50], con expresión precoz de marcadores de diferenciación a capa granulosa, tales como el antígeno KF2, la involucrina o la transglutaminasa, y expresión tardía de la filagrina o de marcadores de las fases precoces de la diferenciación, tales como las queratinas de 67 kd o el antígeno citoplásmico suprabasal que reconoce el anticuerpo BC₁ [34].

En los queratinocitos psoriásicos se han descrito otras alteraciones metabólicas y de diferenciación probablemente secundarias al trastorno de proliferación, aunque es posible que tengan mayor importancia patológica las que corresponden a mecanismos básicos de regulación del funcionamiento y la proliferación celular, tales como la disminución en los niveles de AMP cíclico o el aumento en los de GMP cíclico [51-53], las alteraciones en la síntesis de poliaminas [54,55], el aumento en los niveles de calmodulina [56-61], la expresión de receptores de membrana para epidermal growth factor [62], o el aumento en las actividades de la fosfolipasa C [63], la tirosina-cinasa [64] y las fosfatidilinositol-cinasas [65,66], o la disminución en la actividad de la proteína-cinasa C [67].

Pese a estas evidencias, el defecto primario que determina la proliferación epidérmica podría no encontrarse en los queratinocitos. Los queratinocitos procedentes de pacientes con psoriasis,

sometidos al estímulo del cultivo *in vitro*, no

presentan diferencias significativas en cuanto a la morfología o la capacidad de proliferación con respecto a los queratinocitos normales [68]. Sin embargo, cuando se trasplanta piel

lesional psoriásica a ratones atímicos, la epidermis mantiene sus características patológicas durante más de seis semanas [69].

Hipótesis etiopatogénica psoriasis

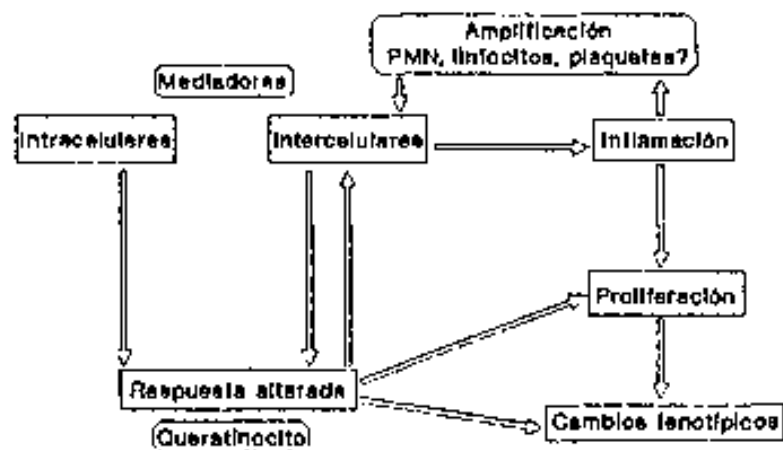


Fig. 1.3.1.2.1

Existen abundantes indicios de que el defecto primario que determina la psoriasis se basa en una alteración de la respuesta de los queratinocitos a la interacción con otros componentes celulares o mediadores presentes en la piel (Fig. 1.3.1.2.1), y en especial a las citocinas (en especial el γ -interferón) y factores de crecimiento (en especial el TGF α , que pueden producir los propios queratinocitos) que regulan de forma paracrina o autocrina la proliferación y estado de activación funcional de los queratinocitos [70-72].

1.3.1.2. FIBROBLASTOS

Recientemente se ha planteado la posibilidad de que exista una alteración básica en los fibroblastos dérmicos de los pacientes con psoriasis, o en su interacción con los queratinocitos [73]. Los fibroblastos cultivados in vitro procedentes de pacientes con psoriasis sintetizan más proteínas y proteoglicanos [74], son hiperproliferativos y presentan una respuesta exagerada a la adición de suero [75,76], lo que probablemente tenga que ver con alteraciones en los mecanismos básicos de transducción de señales en la célula, como indica la detección de un aumento en la actividad de la proteína-quinasa C en las membranas celulares de los fibroblastos procedentes de pacientes psoriásicos [77].

La influencia de los fibroblastos dérmicos en la proliferación epidérmica [78] puede ser especialmente significativa en el caso de la psoriasis: los fibroblastos psoriásicos en cultivo [79] y el sobrenadante procedente de los mismos [80] estimulan la proliferación de los queratinocitos. Por consiguiente, existen evidencias de que los fibroblastos psoriásicos generan mediadores difusibles que modulan la proliferación de los queratinocitos, y esta interacción estaría alterada en la psoriasis. Existen muchos indicios de que algunos eicosanoides, tales como el 15-HETE, podrían intervenir

de modo importante en esta regulación [81].

1.3.1.3. VASCULATURA DÉRMIKA

En la literatura se recogen abundantes evidencias de la presencia de anomalías a nivel de la microvasculatura dérmica en la psoriasis, tales como aumento del flujo sanguíneo cutáneo [82,83] y de la permeabilidad capilar [84,85], dilatación y tortuosidad de las asas capilares [86-89], y presencia de fenestraciones entre las células endoteliales [87], así como otras alteraciones ultraestructurales que dependen de las características clínicas y la actividad de las lesiones [90], si bien pueden detectarse antes de que la hiperproliferación epidérmica se manifieste morfológicamente [86,89,91].

Existe asimismo un aumento en la proliferación de las células endoteliales [84,85,89,92], que indica la presencia de un estímulo angiogénico sobre la microvasculatura dérmica en la psoriasis, que puede deberse a factores humorales [93] producidos por las células inmunocompetentes [94] o tal vez por los propios queratinocitos [95].

1.3.1.4. LEUCOCITOS POLINORFONUCLEARES

Una de las manifestaciones histopatológicas características de la psoriasis es la exocitosis de PMN [84], que se observa focalmente [96], y en relación con las áreas de paraqueratosis [17], constituye para algunos autores una característica prominente de las lesiones incipientes [6], y cuyo acúmulo subcórneo da lugar a los característicos microabscesos de Munro.

El acúmulo de PMN, que en general se considera secundario al efecto

de potentes agentes quimiotácticos procedentes de la epidermis afecta [97], puede aportar diversos mediadores intercelulares capaces de modular los complejos fenómenos inflamatorios y de hiperproliferación epidérmica que caracterizan a la psoriasis.

1.3.1.5. CELULAS INMUNOCOMPETENTES

Con la introducción de los anticuerpos monoclonales en inmunohistopatología a finales de los 70 y el desarrollo de diversas técnicas analíticas en la década de los 80, aumentó la atención de los investigadores hacia el papel fisiopatológico del componente inflamatorio en las lesiones de psoriasis. A finales de los 70 se reevaluó la composición del infiltrado dérmico en las lesiones incipientes de psoriasis, y se observó que estaba constituido por linfocitos T, monocitos y macrófagos [98]. Los estudios de la composición de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica y en las lesiones han dado resultados variables, según la extensión y actividad de la enfermedad y el tipo de lesiones predominantes en cada paciente [99-103].

En 1984 se demostró una disminución del número total de linfocitos T y T helper en sangre periférica en pacientes con afectación extensa, y un reclutamiento selectivo de linfocitos T helper en las lesiones de psoriasis [104]. La cronicidad de las lesiones parece correlacionarse con cierta disminución del porcentaje de células T supresoras en el infiltrado dérmico lesional [101]. Por lo que respecta a las lesiones de psoriasis guttata, se describió un influjo de células T activadas, que desaparecen coincidiendo con un influjo de células T supresoras cuando las lesiones involucionan [104].

Los linfocitos activados se encuentran en aposición con los procesos dendríticos de las células de Langerhans en la epidermis,

cuyo número y proporción que expresa HLA-DR se encuentran aumentados en la psoriasis. Estas observaciones llevaron a Valdimarsson et al. [105] a postular que la psoriasis es un trastorno de la proliferación de los queratinocitos mediado por linfocitos T. La hipótesis inmunológica es compatible con los mecanismos de acción de algunos tratamientos eficaces en la psoriasis, siendo un ejemplo especialmente ilustrativo la reciente introducción de la ciclosporina [106].

También se ha propuesto que la predisposición (con cierta base genética) a la psoriasis pudiera venir determinada por una susceptibilidad específica para responder frente a determinados antígenos, o bien por un defecto en la capacidad de aclaramiento de tales antígenos. Se ha implicado a diversos antígenos como responsables de la inducción de las lesiones de psoriasis, tales como algunas proteínas no histónicas [107,108], antígenos presentes en la capa córnea [109], antígenos estreptocócicos [110] y una proteína retroviral [111].

Una hipótesis alternativa sería que la susceptibilidad a la psoriasis viniera determinada por una alteración de los mecanismos de transducción de señales externas, tales como las citoquinas, y la respuesta a las mismas por parte del queratinocito. Esta hipótesis es la que ofrece posiblemente una visión más global de la enfermedad y dispone de gran número de evidencias experimentales en su favor, por lo que se discutirá más adelante en un apartado propio.

1.3.2. MEDIADORES INTERCELULARES.

Existen múltiples mediadores intercelulares que pueden ser producidos *in situ* o proceder del torrente sanguíneo, y cuyo efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria y la proliferación celular puede estar alterado en la psoriasis, como se describe a continuación.

1.3.2.1. PEPTIDOS: FACTORES DE CRECIMIENTO, CITOCINAS, FACTORES DEL COMPLEMENTO.

La psoriasis se caracteriza por un trastorno en la regulación del crecimiento de los queratinocitos, con una intensa hiperplasia epidérmica. La proliferación de las células eucariotas generalmente se controla mediante la expresión celular de receptores para factores de crecimiento y la subsiguiente exposición a ligandos para dichos receptores. La hiperplasia epidérmica en la psoriasis podría estar en relación con un aumento en la expresión de factores de crecimiento o de sus receptores. Por consiguiente, es esencial identificar los factores de crecimiento específicos o las citocinas promotoras del crecimiento que regulan la proliferación de los queratinocitos normales y cuya expresión aberrante podría estar implicada en la patogénesis de la psoriasis.

1.3.2.1.1. FACTORES DE CRECIMIENTO.

El factor de crecimiento epidérmico, o epidermal growth factor (EGF), purificado a partir de las glándulas maxilares del ratón, produce una acantosis epidérmica marcada cuando se inyecta por vía intradérmica en la piel del ratón [112]. El EGF es esencial para mantener el crecimiento de los queratinocitos humanos en diversos

sistemas de cultivo celular *in vitro*. El factor de crecimiento transformante-alfa, o transforming growth factor-alpha (TGF- α), es un factor peptídico homólogo al EGF, al que puede substituir como requisito de cultivo, siendo ligeramente más potente que este último [113]. El EGF y el TGF- α regulan la proliferación celular a través de su interacción con un mismo receptor de membrana de 180 kD, que se denomina receptor para EGF (r-EGF) por motivos históricos [114]. La unión del ligando al dominio extracelular del receptor para EGF activa una tirosina-cinasa localizada en el dominio intracelular del receptor. El complejo receptor-ligando es posteriormente eliminado de la superficie celular por internalización mediante pinocitosis, lo que determina una "disminución" ("down-regulation") del receptor para EGF por acción del EGF o el TGF- α . La activación mitogénica de las células tras la interacción entre el receptor para EGF y su ligando viene determinada por la activación de la tirosina-cinasa, la internalización del receptor y otros acontecimientos bioquímicos desencadenados por la unión del factor de crecimiento [115].

El TGF- α , cuya producción *in vivo* por las células de melanoma se ha correlacionado con la producción de acantosis nigricans paraneoplásica y la aparición del signo de Leser-Trélat [116], es un excelente candidato como regulador autocrino de la proliferación epidérmica. El TGF- α es producido por los queratinocitos en la epidermis humana normal y en cultivo [117,118]. La transcripción de ARN mensajero correspondiente a TGF- α por parte de los queratinocitos se ve aumentada por la unión del EGF o el TGF- α a su receptor, lo que determina un aumento en la liberación de TGF- α por parte de las células estimuladas [117]. La producción de TGF- α por parte de los queratinocitos también puede verse incrementada por efecto de los forboles, lo que indicaría un posible mecanismo de la hiperplasia producida por estos agentes [119]. Puesto que la renovación de la epidermis normal requiere una proliferación constante de queratinocitos, el TGF- α producido localmente por los

mismos queratinocitos podría ser un importante regulador autocrino o paracrino del crecimiento epidérmico normal.

1.3.2.1.2. INTERLEUCINAS.

La interleucina-1 es un mediador producido por la mayoría de células nucleadas que estimula el crecimiento y diferenciación de diversas estirpes celulares, entre las que se incluyen los linfocitos y los queratinocitos; existen evidencias de que el epidermal thymocyte activating factor (ETAf) es una clase de interleucina-1 [120].

Recientemente se ha demostrado la presencia de interleucina-1 en las placas y escamas psoriásicas [121,122]. Aunque su procedencia no está clara, puede ser producida por los queratinocitos, los PMN y las células de langerhans, como resultado del estímulo del γ -interferón sintetizado por los linfocitos T. La interleucina-1 puede contribuir al acúmulo de PMN y la producción de signos inflamatorios tales como el eritema y el edema [123,124], por su efecto sobre el endotelio vascular, o bien de forma indirecta, estimulando la síntesis de PGE₂ por parte de los propios queratinocitos [125]. Asimismo, la interleucina-1 puede estimular la proliferación de los queratinocitos y los fibroblastos y activar funcionalmente a diversas estirpes celulares, tales como los fibroblastos y las células endoteliales [126]. Existen evidencias de la producción de otras interleucinas (IL-3, IL-6) y citocinas (factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, GM-CSF, o transforming growth factor-beta, TGF- β) por parte de los queratinocitos en cultivo [72]. Tanto la IL-1 como la IL-3, la IL-6 y el GM-CSF estimulan la proliferación de los queratinocitos, mientras que el TGF- β inhibe al parecer el crecimiento de los mismos [127,128], pero su posible participación en la fisiopatología de la psoriasis es menos clara. Recientemente se ha

descrito el efecto promotor del GM-CSF sobre la síntesis de leucotrienos por parte de los neutrófilos humanos [129], lo que podría ser de gran importancia en situaciones de interrelación entre los queratinocitos y los PMN, como ocurre en las lesiones de psoriasis.

1.3.2.1.3. INTERFERONES

Se ha demostrado la presencia de τ -Interferón y trazas de α -interferón en el contenido de ampollas inducidas por succión sobre placas de psoriasis [130,131]. El τ -interferón induce la expresión de antígenos HLA-D en los queratinocitos, las células de Langerhans y las células endoteliales, así como la producción de interleucina-1 en diversos tipos celulares. Los interferones tienen una diversidad de efectos biológicos que pueden participar en la fisiopatología de la psoriasis, en especial a través de la modulación de la respuesta inmunológica [132,133] y de la regulación inhibitoria de la proliferación de los queratinocitos [71, 134], tal vez a través de la síntesis de TGF- α o la modulación de la expresión de los receptores para EGF [72].

Existen datos contradictorios [133,135,136] sobre el efecto neto de diversos interferones, que incluso se han ensayado terapéuticamente [137], en la psoriasis.

Inicialmente se describió el efecto adverso de dosis altas de α -IFN en tres pacientes con carcinoma renal metastático, produciéndose en dos de ellos una exacerbación de una psoriasis preexistente, y en el tercer paciente, su desencadenamiento durante el tratamiento [135]. Sin embargo, también se describió una respuesta satisfactoria en un paciente con psoriasis guttata de larga evolución tratado con α -IFN [136].



Posteriormente se publicó una serie de 12 pacientes psoriásicos con respuesta insuficiente a los tratamientos previos, que fueron tratados con α -IFN recombinante intramuscular durante hasta 4 semanas [137]. Se observó una remisión completa en un paciente, y parcial en otros tres, pero en los ocho restantes no se observó ninguna mejoría, produciéndose empeoramiento en cinco.

Recientemente se ha descrito la producción de focos puntiformes de psoriasis en el lugar de inyección de τ -interferon [138]. Si bien los efectos inmunomodulador, antiproliferativo y posiblemente antivírico, de los interferones constituyen bases teóricas para su posible utilidad terapéutica en la psoriasis, nuestros conocimientos en la actualidad son insuficientes, y junto con los datos contradictorios de la experiencia clínica que se acaba de resumir, obligan a considerar como prematura dicha indicación.

1.3.2.1.4. FACTORES DEL COMPLEMENTO.

Se ha descrito la presencia de C_{3n} y otros factores quimiotácticos en las escamas psoriásicas [139]. La proliferación epidérmica en la psoriasis precede al depósito de inmunoglobulinas y complemento [140], lo que sugiere que la presencia de factores del complemento probablemente sea un fenómeno secundario, y no debido a la formación de inmunocomplejos, aunque pueden contribuir al influjo de PMN y a su activación funcional.

1.3.2.4. LIPIDOS: EICOSANOIDES, PROSTANOIDES Y PAF

Se ha demostrado la presencia de niveles elevados de ácido araquidónico y algunos de sus metabolitos por la vía de las lipoxigenasas (LTB_4 , 12-HETE) y la ciclooxigenasa (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$) en las placas de psoriasis [141-151]. Los eicosanoides tienen una

serie de efectos relevantes en cuanto a la fisiopatología de la psoriasis [152]. El LTB₄ es uno de los agentes quimiotácticos más potentes para los PMN, y su aplicación tópica sobre la piel normal puede inducir la formación de microabscesos intraepidérmicos semejantes a los de Munro, aunque no determina la aparición de lesiones clínicas. El LTB₄ también induce la proliferación de los queratinocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. El 12-HETE tiene efectos similares a los del LTB₄; su menor potencia podría estar compensada por su presencia en mayor concentración, con lo que la importancia fisiopatológica de ambos eicosanoides podría ser similar.

Aunque la presencia de niveles elevados de eicosanoides en las placas de psoriasis probablemente no sea una alteración primaria desde el punto de vista etiopatogénico, su contribución a la proliferación epidérmica y los cambios inflamatorios que caracterizan a esta enfermedad es sin duda muy importante.

La presencia de niveles aumentados de AA en las placas de psoriasis se debe no sólo a una mayor actividad de la fosfolipasa A₂ [153, 154] (Fig. 1.3.2.2a), sino también de la fosfolipasa C [63,155], con producción de diacilglicerol, cuyos niveles están aumentados en las lesiones de psoriasis con respecto a la piel no lesional y normal [156], y conversión del mismo a AA (Fig. 1.3.2.2b), como se discute más adelante.

La activación de la fosfolipasa A₂ también determina la producción de otro mediador lipídico, el PAF (platelet activating factor) (Fig. 1.3.2.2c), que se ha encontrado en concentraciones elevadas en las lesiones psoriásicas [97]. El PAF [157] induce la activación de la fosfolipasa C, la liberación de eicosanoides por parte de los queratinocitos normales, una modulación funcional de los linfocitos y la liberación, por parte de los terminales nerviosos periféricos, de sustancia P, que también podría intervenir en la fisiopatología de la psoriasis [158].

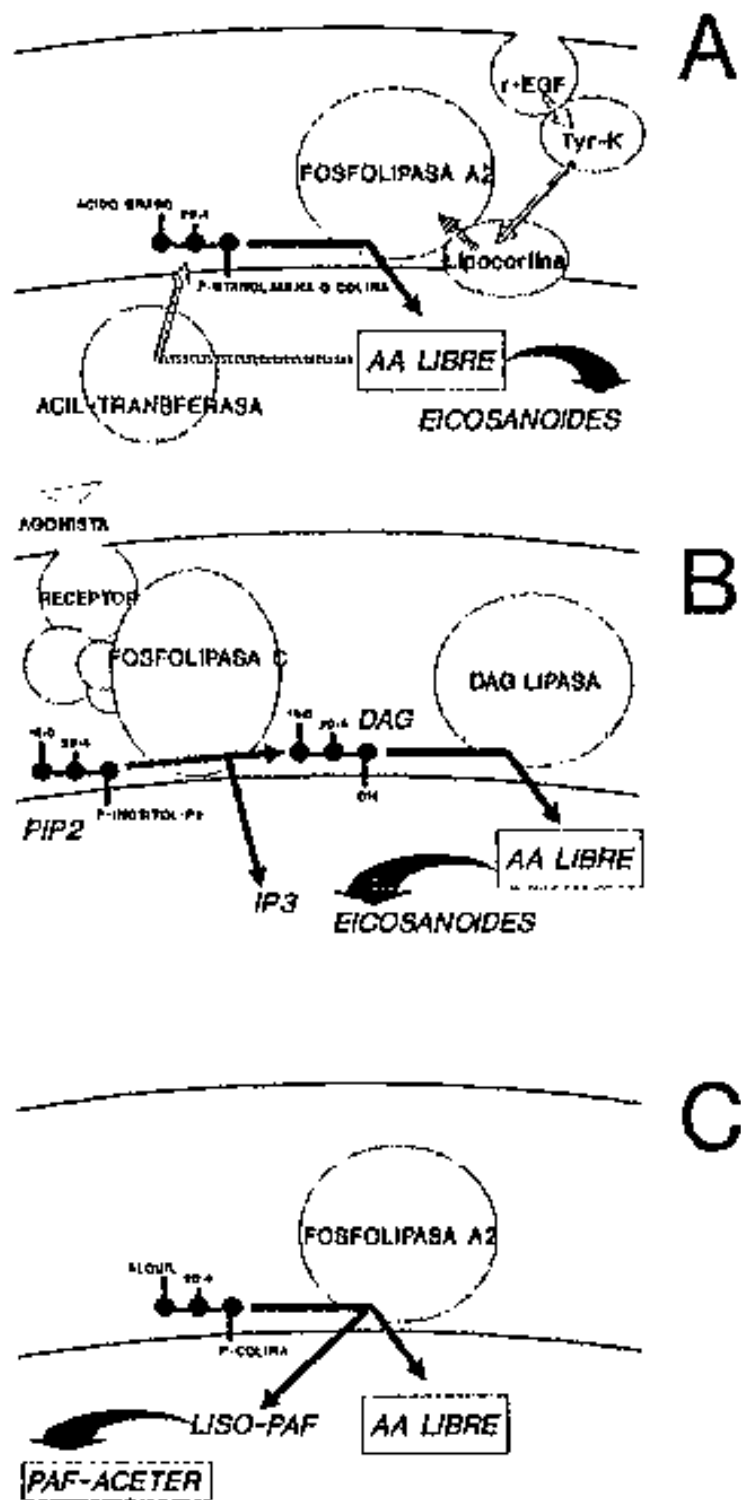


Fig. 1.3.2.2

1.3.3. MEDIADORES INTRACELULARES.

La regulación funcional del queratinocito, al igual que la de los demás tipos celulares, se basa en la interacción de los diferentes mediadores intercelulares sobre sus receptores específicos situados en la membrana celular. A través de diversos sistemas de acoplamiento se produce la formación de mediadores intracelulares (segundos mensajeros), de los que los mejor conocidos son los nucleótidos cíclicos (AMP cíclico y GMP cíclico), algunos productos intermediarios del metabolismo lipídico de la membrana celular, tales como el diacilglicerol y los polifosfatos de inositol, y el Ca^{2+} .

Algunas evidencias recientes apuntan hacia un posible papel de los metabolitos del AA como segundos mensajeros intracelulares. Así pues, los eicosanoídes tendrían una función reguladora de la actividad de diversos tipos celulares por medio de la existencia de receptores específicos, y en la psoriasis existirían alteraciones de estos mecanismos homeostáticos.

A continuación se discuten los sistemas de acoplamiento y los segundos mensajeros que intervienen en la patogenia de la psoriasis, así como las posibles implicaciones de su modulación farmacológica.

1.3.3.1. SISTEMAS DE ACOPLAMIENTO. CINASAS.

Las cinasas son proteínas generalmente asociadas a los receptores de membrana que, al activarse, catalizan una fosforilación dependiente de ATP de diversas enzimas funcionales, modificando su actividad y modulando la diferenciación y proliferación celulares. Las principales cinasas, que se discuten a continuación, son la

proteín-cinasa A, la tirosina-cinasa, la proteín-cinasa C, las proteín-cinasas G y la calmodulina-cinasa.

1.3.3.1. PROTEÍN-CINASA A.

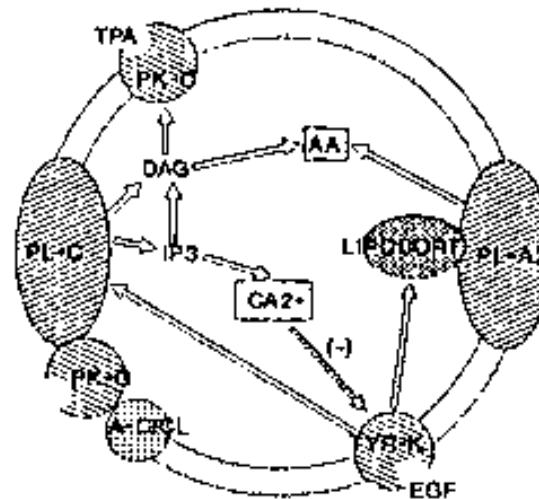
La proteín-cinasa A, o dependiente de AMP cíclico, es la primera que se descubrió y la mejor conocida de las proteín-cinasas [159], y se considera el principal mecanismo de regulación del funcionamiento celular por parte del AMP cíclico, que interviene en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos [160]. En relación con la psoriasis, no se ha podido demostrar la existencia de diferencias cuantitativas o cualitativas entre la piel normal y psoriásica, por lo que respecta a la proteín-cinasa-A [161].

1.3.3.1.2. TIROSINA-CINASA.

El epidermal growth factor (EGF) y otros factores de crecimiento peptídicos [162] actúan a través de un receptor específico que consiste en una proteína de membrana de 170 kd con actividad tirosina-cinasa [163], es decir, que fosforila a los enzimas que le sirven de sustrato a nivel de una tirosina. La activación de la tirosina-cinasa da lugar a una activación del metabolismo de los polifosfatos de inositol [164], así como a la fosforilación de diversas proteínas funcionales [115].

Una de estas proteínas funcionales que se activa por efecto de la fosforilación mediada por la tirosina-cinasa acoplada al receptor de membrana para EGF es la lipocortina, una proteína de 40 Kd que actúa como inhibidor de la fosfolipasa A_2 [165]. Cuando la lipocortina se fosforila, permite la activación de la fosfolipasa A_2 [166,167], dando lugar a la liberación de AA y la producción de sus metabolitos, prostanoídes y eicosanoídes (Fig. 1.3.3.1.2.1).

Tirosina-cinasa acoplada al receptor para EGF



De este modo se explicaría el efecto del EGF sobre diversos sistemas celulares, y uno de los posibles mecanismos de acción terapéutica de los corticoides, que inducirían la síntesis de lipocortina [168].

La actividad y expresión del receptor para EGF, que se encuentran alteradas en la psoriasis [62], vendrían moduladas a su vez por la concentración intracitoplasmática de Ca^{2+} , la fosforilación de la tirosina-cinasa por parte de la protein-cinasa C y los propios niveles de EGF (lo que se denomina "down-regulation") [115].

1.3.3.1.3. PROTEIN-CINASA C.

La protein-cinasa C [169] es una enzima dependiente de Ca^{2+} y activada (a través de su translocación a la membrana celular) por el diacilglicerol [170] y posiblemente por el AA [171], y que fosforila gran número de proteínas esenciales para la regulación de la fisiología celular. Entre estas enzimas funcionales se encuentran la tirosina-cinasa acoplada al receptor para EGF, la lipocortina y las proteínas G, que actúan como cinasas. Existen evidencias recientes de que la protein-cinasa C es en realidad una familia de proteínas con diferentes patrones de expresión tisular

y localización intracelular, que responden a diferentes activadores y ejercen diferentes funciones biológicas [172].

Las protein-cinasas C ejercen un feed-back negativo sobre diversas etapas del proceso de transducción de señales celulares, tanto en las respuestas a corto plazo como a largo plazo (Fig 1.3.3.1.3.1).

A corto plazo, la protein-cinasa C disminuye el aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular inducido por inositol-trifosfato. Este efecto puede deberse a una inhibición de la síntesis de inositol-trifosfato y diacilglicerol por parte de la fosfolipasa C, o a un aumento de la degradación del

Protein-cinasa C Mecanismo feed-back negativo

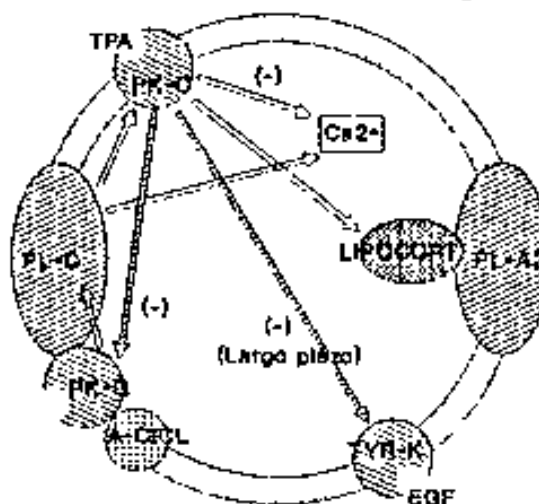


Fig. 1.3.3.1.3.1

inositol-trifosfato por parte de una fosfatasa. La protein-cinasa C también puede aumentar la salida de Ca^{2+} hacia el medio extracelular (véase más adelante) activando las bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP.

El control a largo plazo de la activación celular por parte de la protein-cinasa C puede efectuarse a través de la fosforilación del receptor para epidermal growth factor, determinando una disminución de su afinidad y de la actividad de la tirosina-cinasa ("down-regulation").

El forbol éster, algunos factores de crecimiento y diversos oncogenes ejercen su compleja regulación de la proliferación y el metabolismo celular por medio de un receptor de membrana acoplado a la protein-quinasa C [173]. Recientemente se ha descrito una disminución en la actividad de la protein-quinasa C en la epidermis psoriásica con respecto a la normal [67], así como un aumento de su actividad en las membranas de los fibroblastos procedentes de lesiones de psoriasis [77], cuya implicación patogénica se desconoce.

1.3.3.1.4. PROTEIN-CINASAS G.

Las proteínas G [174], dependientes de la hidrólisis de GTP, que da lugar a GMP cíclico, tienen un especial interés porque regulan la actividad de diversas enzimas funcionales tales como la adenilato-ciclasa, que determina la síntesis de AMP cíclico, y la fosfolipasa C, que determina el metabolismo de los polifosfatos de inositol, y, en consecuencia, los

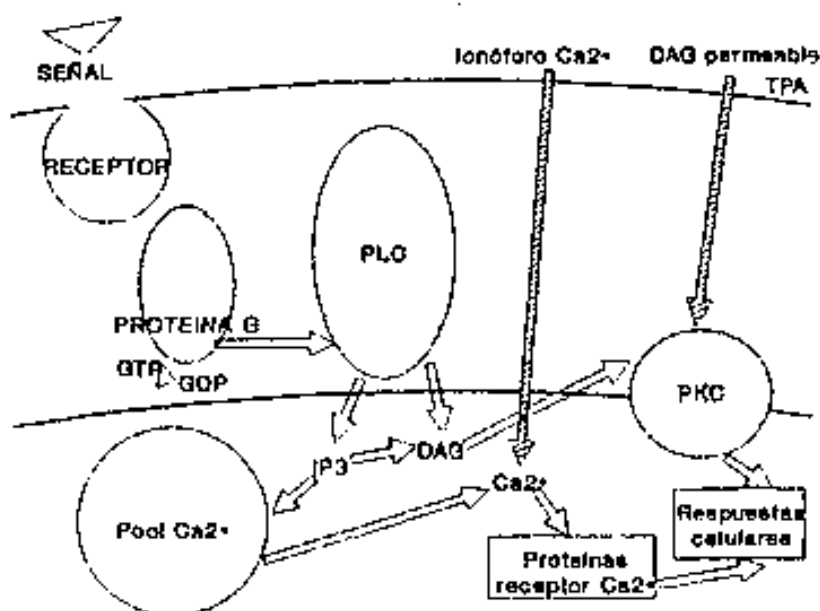


Fig. 1.3.3.1.4.1

los niveles intracelulares de Ca^{2+} (ver más adelante), lo que constituye un mecanismo de autorregulación [175] (Fig. 1.3.3.1.4.1).

1.3.3.1.5. FOSFATIDILINOSITOL-CINASA.

La fosfatidilinositol-cinasa es una proteína de 85 kD asociada a los receptores para diversos factores de crecimiento, que interviene en la vía metabólica de los polifosfatos de inositol, dando lugar a la síntesis de fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP₂). Esta molécula constituye el sustrato de la fosfolipasa C y el reservorio molecular para dos importantes segundos mensajeros, el diacilglicerol y el inositol-trifosfato, que determinan la activación de la protein-cinasa C y el influjo de Ca²⁺ en el citoplasma, regulando gran número de funciones celulares.

Recientemente se ha demostrado un aumento de 7 veces en la actividad de la fosfatidilinositol-cinasa en biopsias de epidermis afecta, pero no en la no afecta, procedentes de pacientes con psoriasis [66], lo que indica la participación de este enzima en la patogénesis de la psoriasis a nivel de mediadores intracelulares.

Existen evidencias adicionales de que las vías metabólicas de transducción de mensajes están alteradas en la epidermis psoriásica (Fig 1.3.3.1.5.1), puesto que los niveles totales de fosfolipasa C están

aumentados [63], y los de protein-cinasa C están disminuidos por down-regulation [67], como se observa en situaciones de activación

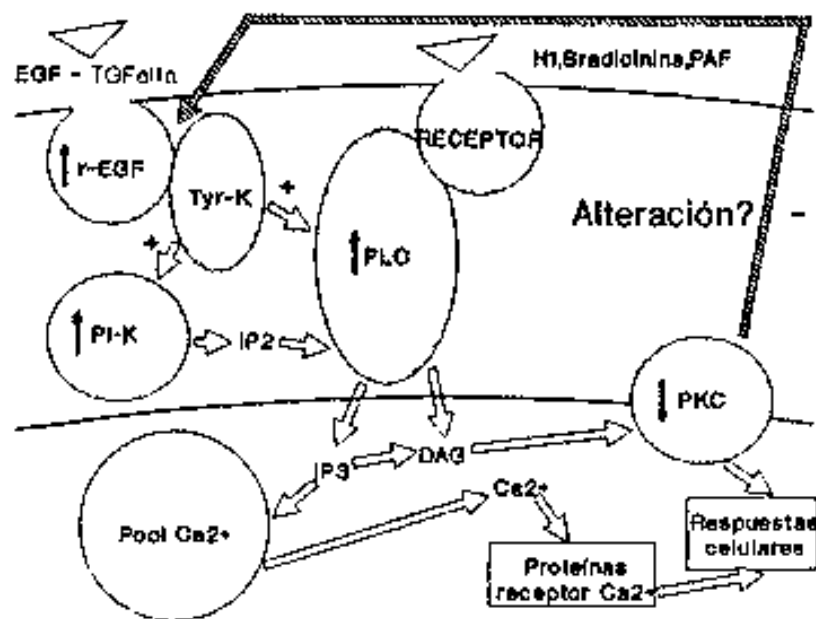


Fig. 1.3.3.1.5.1

crónica de este enzima por forbol-ésteres o como consecuencia de la activación de la fosfolipasa C. Por otra parte, el tratamiento de las células con epidermal growth factor y platelet-derived growth factor produce un aumento en la actividad de la fosfatidilinositol-cinasa, que se asocia a los receptores para dichos factores de crecimiento y es activada por la actividad tirosina-cinasa de los mismos [176,177].

1.3.3.1.6. CALMODULINA-CINASA.

Las cinasas dependientes de calmodulina constituyen un sistema general de regulación del funcionalismo celular a través de la fosforilación de diversas proteínas [178], especialmente en aquellas situaciones que requieren una respuesta rápida, mientras que la vía de la protein-cinasa C permitiría un control más sostenido [175]. La interrelación entre ambas vías de fosforilación de proteínas funcionales y con los nucleótidos cíclicos, los lípidos de membrana derivados de la acción de las fosfolipasas C y A₂ (diacilglicérol, polifosfatos de inositol), AA y sus metabolitos) y los niveles de Ca²⁺ en el citosol determinan un balance homeostático muy delicado y demasiado complejo para ser comprendido totalmente en la actualidad. Sin embargo, existen evidencias de la implicación de la calmodulina-cinasa en la psoriasis, al haberse demostrado una elevación de sus niveles en las placas de psoriasis [56,58-61,179], que se normaliza con el tratamiento [179].

1.3.3.2. REGULACION INTRACELULAR. SEGUNDOS MENSAJEROS.

La regulación intracelular del funcionalismo celular se efectúa a través de la acción de una serie de segundos mensajeros de naturaleza diversa, tales como los nucleótidos cíclicos (AMP cíclico y GMP cíclico), los mediadores lipídicos derivados de la

cción de las fosfolipasas sobre los fosfolípidos de membrana (diacilglicerol, polifosfatos de inositol, AA, prostanoïdes y eicosanoïdes) y el ión Ca^{2+} .

1.3.3.2.1. AMP CICLICO Y GMP CICLICO.

Los nucleótidos cíclicos, en particular el AMP cíclico y el GMP cíclico, tienen un papel importante como segundos mensajeros en la regulación universal del funcionalismo celular, a través de la fosforilación específica de diversos enzimas. La síntesis de nucleótidos cíclicos se efectúa por medio de ciclasas, y su degradación mediante fosfodiesterasas, susceptibles de regulación fisiológica y farmacológica [53].

Existen diversas sustancias, tales como las catecolaminas, la histamina, la toxina colérica o el AA y sus metabolitos (prostaglandinas, 12-HETE y 15-HPETE) [53,180-182], que regulan los niveles intracelulares de AMP cíclico. Esta acción se efectúa a través de receptores de membrana específicos que se encuentran acoplados a una proteína G con actividad guanilatociclasa, que determina la producción de GMP cíclico y regula los niveles intracelulares de AMP cíclico por medio de la activación o inhibición de la adenilatociclasa [174].

En la psoriasis existen evidencias de un desequilibrio en los niveles de nucleótidos cíclicos, con disminución de los niveles de AMP cíclico y aumento relativo de los niveles de GMP cíclico, que se correlacionan experimentalmente con la situación de hiperproliferación y las alteraciones en la diferenciación y el metabolismo epidérmico que existen en la psoriasis [52,53,180-182]. Las alteraciones en los niveles de nucleótidos cíclicos pueden explicar en parte el efecto de los β -bloqueantes, el litio o las xantinas sobre la psoriasis, aunque no han tenido implicaciones

farmacológicas, debido a la compleja regulación de este sistema.

1.3.3.2.2. MEDIADORES DERIVADOS DE LA ACCIÓN DE LAS FOSFOLIPASAS SOBRE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA.

Las fosfolipasas actúan hidrolizando los fosfolípidos que constituyen un componente esencial de la membrana celular, regulando su metabolismo y reciclado. Las diversas fosfolipasas reciben su denominación de acuerdo con el lugar en el que tiene lugar su acción hidrolítica, dando lugar a diversas moléculas, con cierta especificidad de sustrato (Fig. 1.3.3.2.2.1). Sin duda alguna, las interacciones entre el metabolismo de los fosfolípidos de membrana (que da lugar a segundos mensajeros tan importantes como el diacilglicerol, los polifosfatos de inositol, el AA y sus metabolitos o el PAF) y el acoplamiento de las respuestas celulares frente a estímulos externos son complejas [183], lo que dificulta su comprensión integral.

En la epidermis existen dos tipos de fosfolipasa C solubles; uno de ellos está regulada por los niveles intracelulares de Ca^{2+} y da lugar a la hidrólisis del fosfatidilinositol. El segundo tipo es regulado por GTP, a través de una proteína G, e hidroliza el fosfatidilinositol-4- β -bifosfato (IP_2). El

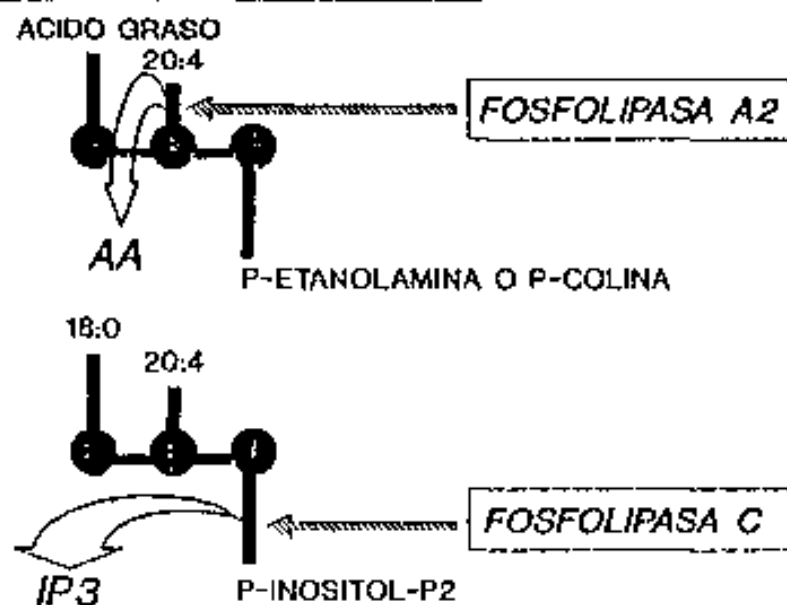


Fig. 1.3.3.2.2.1

primer tipo da lugar a la movilización del AA, mientras que el segundo interviene en la síntesis de diacilglicerol e inositol-trifosfato. Ambos tipos de fosfolipasa C se han identificado en la epidermis humana [184] y sus niveles se han encontrado aumentados en las placas de psoriasis, pero no en la piel no afectada de estos enfermos [63].

Diversos factores de crecimiento (el platelet-derived growth factor (PDGF), por ejemplo) [185] y oncogenes [186] actúan sobre un receptor acoplado a la fosfolipasa C de membrana, que hidroliza el IP_2 dando lugar a diacilglicerol e inositol-trifosfato. El diacilglicerol actúa como segundo mensajero fosforilando la protein-quinasa C [170], mientras que el inositol-trifosfato y otros productos de su metabolismo intermediario actúan como segundos mensajeros intracitoplasmáticos [187] movilizando el Ca^{2+} intracelular, que se almacena principalmente en el retículo endoplásmico.

La activación de la fosfolipasa A_2 a través del efecto del aumento en el Ca^{2+} intracelular sobre la calmodulina-quinasa [178], así como mediante la fosforilación de la lipocortina por parte de la protein-quinasa C [173] o la tirosina-quinasa [185], dan lugar a la liberación de AA y la activación de su metabolismo, produciendo prostanoïdes y eicosanoïdes. Existen evidencias de que estos derivados del AA pueden actuar a su vez como segundos mensajeros intracelulares. El AA y sus metabolitos por las vías de la ciclooxigenasa y las lipoxigenasas podrían regular este complejo sistema de señales a través de la protein-quinasa C [171] y la guanilato-ciclasa [180-182], por ejemplo. La reciente demostración de la existencia de receptores para 12-HETE [188,189], LTB₄ [190] y LTC₄ [191] en los queratinocitos es otra evidencia en apoyo de la función homeostática de los eicosanoïdes.

1.3.3.2.3. CA²⁺.

El Ca²⁺ tiene un papel fundamental en la fisiopatología de la psoriasis y, de modo general, en la regulación del fisiologismo celular. La proliferación y diferenciación de los queratinocitos *in vitro* se ve afectada por los niveles de Ca²⁺ en el medio de cultivo [192]. La hipocalcemia puede determinar exacerbaciones de la psoriasis vulgar y pustulosa [193], y la aplicación tópica y la administración sistémica de 1,25-dihidroxi-vitamina D₃ constituyen un tratamiento efectivo de esta enfermedad [194].

El Ca²⁺, directamente o bien a través de la activación de algunas proteinasas C [172] o, fundamentalmente, de la calmodulina-cinasa [178], modula el funcionamiento de multitud de enzimas reguladores, tales como la adenilato-ciclasa, la guanilato-ciclasa, la fosfo-diesterasa, la fosfolipasa A₂ o la ornitín-decarboxilasa, que están involucradas en la patogenia de la psoriasis (Fig. 1.3.3.2.3.1).

Regulación Ca²⁺

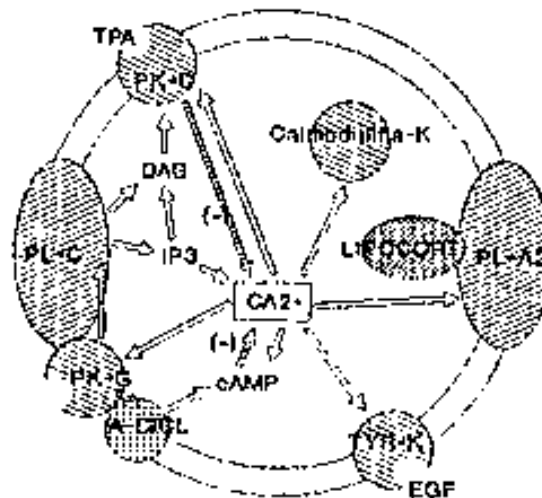


Fig. 1.3.3.2.3.1

La regulación de Ca²⁺ intracelular es un proceso complejo que involucra a numerosas enzimas y vías de señalización. El diagrama muestra cómo el Ca²⁺ actúa como un segundo mensajero, regulando la actividad de enzimas como PK-C, PK-A, PK-G, PK-D, PLC, PL-A2, LIPOCORT, YB-K, EGF, Calmodulina-K, IP3, DAG, CAMP y TPA.

El mantenimiento de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ entre 100 y 200 nM es esencial para la integridad funcional de la célula, y se efectúa gracias a [175]: 1) diversas bombas de Ca²⁺ dependientes de ATPasa, que trabajan contra gradiente expulsando

Ca²⁺ hacia el medio extracelular o las mitocondrias, que actúan como reservorio; el funcionamiento de estas bombas es regulado por los propios niveles de Ca²⁺ a través de las protein-quinasas C y A y la calmodulina-quinasa; 2) la entrada rápida de Ca²⁺ hacia el citosol a través de los canales de Ca²⁺ de la membrana celular, activados fisiológica y farmacológicamente por la unión a diversos receptores, y 3) la entrada de Ca²⁺ procedente del retículo endoplásmico hacia el citosol, activada por el inositol-trifosfato.

1.3.4. HIPOTESIS UNITARIA.

La psoriasis constituye un modelo para el estudio de las alteraciones de la proliferación y diferenciación epidérmica. En la actualidad, la etiología de esta enfermedad continúa siendo desconocida, pero se sabe que existen alteraciones de los mecanismos universales de regulación endógena y exógena del fisiologismo celular. Es probable que en la psoriasis exista una alteración básica de los mecanismos de transducción de las señales que determinan la respuesta biológica frente a los estímulos externos y la comunicación celular entre el queratinocito (principal componente de la epidermis) y otros tipos celulares.

Se ha propuesto una hipótesis unitaria para explicar, al menos en parte, estas alteraciones: para que se manifestara la psoriasis sería necesaria la coexistencia de una interacción alterada del sistema inmune cutáneo con los queratinocitos epidérmicos, determinando una alteración fenotípica y proliferativa que se mantendría como resultado de la existencia de un trastorno en el acoplamiento de los sistemas de transducción de mensajes intra y extracelulares.

Los primeros acontecimientos desde el punto de vista inmunológico implicarían una activación de los dendrocitos dérmicos o los

linfocitos T del sistema inmune cutáneo, que producirían τ -interferón, que incrementaría la producción de TGF- α por parte del queratinocito; este factor produce una disminución en la sensibilidad del propio queratinocito a los efectos del τ -interferón (Fig. 1.3.4.1). En consecuencia, se produce una menor expresión de HLA-DR, conservándose focalmente la expresión de ICAM, por requerir menor estímulo por parte del τ -interferón, y una menor inhibición del crecimiento de los queratinocitos [71]. La llegada de otras células del sistema inmune cutáneo, con la síntesis adicional de citoquinas y factores de crecimiento, amplificaría el proceso, lo que conduciría a una expansión de la población de que-

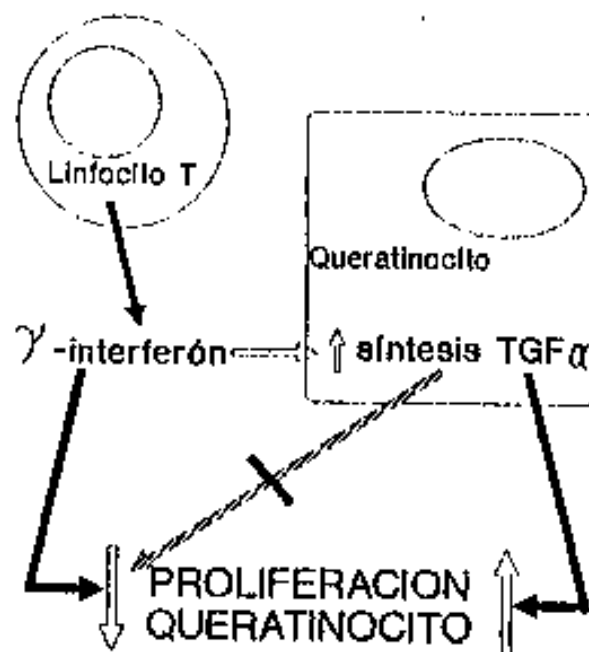


Fig. 1.3.4.1

ratinocitos cuya proliferación no se ve inhibida por el τ -interferón, como se observa en cultivos in vitro de queratinocitos procedentes de placas de psoriasis [134].

Por otra parte, la activación de la fosfolipasa C en la psoriasis [63], secundaria al estímulo de diversos mediadores extracelulares, determinaría la producción de diacilglicerol y el aumento en los niveles de Ca^{2+} intracitosólico a través de la acción del inositol-trifosfato; estos mediadores activan a la protein-quinasa C, aunque esta actividad se reduciría rápidamente por down-regulation, determinando la presencia de niveles bajos en la epidermis psoriá-

sica [67].

La incubación de queratinocitos en cultivo con fosfolipasa C exógena produce alteraciones en el contenido de diacilglicerol y la actividad de la protein-quinasa C similares a los que se observan en la epidermis psoriásica, así como una diferenciación terminal acelerada, análoga a la situación existente in vivo [195]. El queratinocito "psoriásico" presentaría un trastorno en la regulación de la protein-quinasa C que permitiría un aumento en la expresión de receptores para EGF, que serían a su vez activados por el TGF- α producido "en exceso".

En síntesis, el mantenimiento del fenotipo hiperproliferativo psoriásico se podría deber a la existencia de un trastorno del acoplamiento a diversas protein-quinasas y fosfolipasas que regulan los niveles y la actividad de los segundos mensajeros intracelulares (Fig. 1.3.4.2).

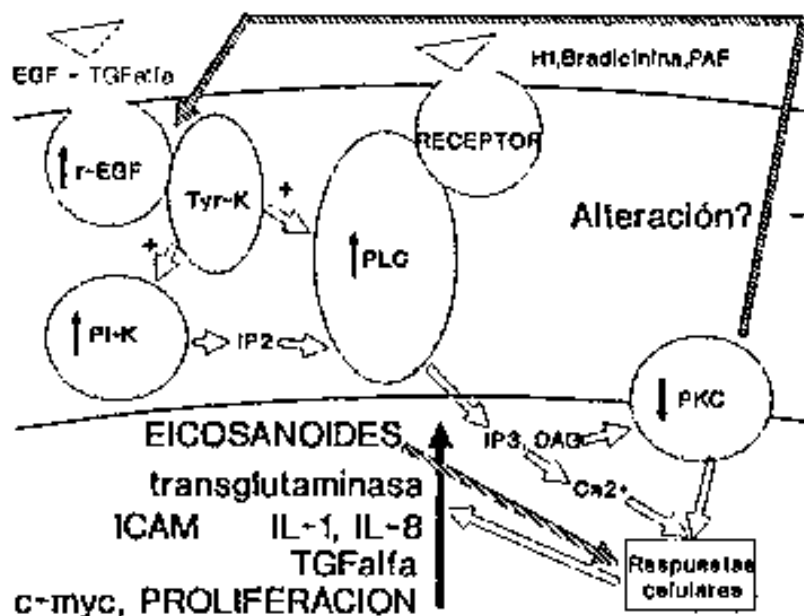


Fig. 1.3.4.2

En esta situación, los mediadores derivados de los lípidos de la membrana celular, tales como el AA y sus metabolitos, tendrían un papel secundario pero importante en cuanto a los mecanismos de regulación homeostática, actuando como mensajeros intracelulares y regulando la transducción de señales que determina las alteraciones en la proliferación y diferenciación que caracterizan a la psoriasis.

Por otra parte, los mediadores lipídicos, y en especial los eicosanoides, también actuarían como mediadores extracelulares, a través de receptores específicos de membrana, sobre los propios queratinocitos y otros tipos celulares (fibroblastos, PMN, monocitos, linfocitos) que intervendrían en la modulación de la proliferación del queratinocito epidérmico y en la respuesta inflamatoria que caracteriza a la psoriasis, la cual a su vez aportaría una mayor cantidad de eicosanoides y otros mediadores lipídicos y proteicos que amplificarían el proceso.

El estudio de la fisiopatogenia de la psoriasis y la regulación funcional del queratinocito puede proporcionar claves que permitan un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la proliferación celular fisiológica (crecimiento, reparación), patológica y neoplásica, así como posibles nuevas vías de intervención farmacológica sobre los mismos.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, el estudio del papel de los eicosanoides en la fisiopatogenia de la psoriasis, y su posible modulación mediante fármacos con potencial terapéutico, constituyen un importante objetivo de investigación en Dermatología, y han determinado la realización de la presente tesis.

A continuación se discute el estado actual de los conocimientos en relación al papel de los eicosanoides en la fisiopatogenia de la psoriasis y sus implicaciones terapéuticas.

1.4. BIOQUIMICA DE LOS EICOSANOIDES.

El término "eicosanoide" se emplea para denominar a una gran familia de ácidos carboxílicos poli-insaturados de cadena lineal con 20 átomos de carbono. La familia de los eicosanoides se compone

de tres ramas principales (Fig. 1.4.1), la de los prostanoicos (prostaglandinas y tromboxanos), que se sintetizan por la vía de la ciclooxigenasa, la de los leucotrienos y determinados mono-, di- y tri-hidroxiácidos que se forman por las vías de la lipoxigenasa y la de los epóxidos que se sintetizan por la vía de la epoxigenasa, en la que interviene el citocromo P-450.

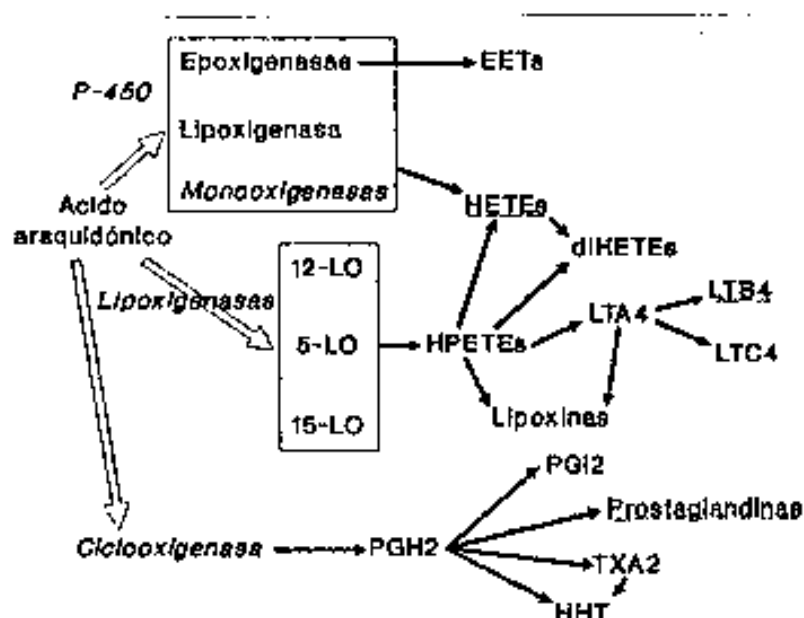


Fig. 1.4.1. Vías metabólicas del AA.

Los eicosanoides se sintetizan a partir de los ácidos grasos poliinsaturados naturales de 20 átomos de carbono que contienen tres a cinco dobles enlaces conjugados en posición cis. Tales ácidos grasos incluyen el ácido 8,11,14-eicosatrienoico (Ácido dihomogammalinolénico) y el ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (Ácido araquidónico), que pertenecen a la familia de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales ω -6, así como el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, presente en el aceite de pescado, que pertenece a la familia de los ω -3 (Fig. 1.4.2).

Los leucotrienos, pero no las prostaglandinas o los tromboxanos, pueden sintetizarse a partir del ácido 5,8,11-eicosatrienoico, un ácido graso ω -9. El principal precursor en las células de mamífero es el ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono más abundante, que es el AA, y habitualmente se encuentra esterificado en la posición 2 de los fosfolípidos de membrana.

Una limitación del término "eicosanoides" es que determinados ácidos grasos de 18 y 22 átomos de carbono, tales como el ácido octadecadienoico (ácido linoleico, 18:2 ω 6), el ácido docosapentaenoico (22:5 ω 6) y el ácido docosahexaenoico (22:6 ω 3) pueden convertirse en homólogos eicosanoides, que no son eicosanoides en el sentido estricto del término.

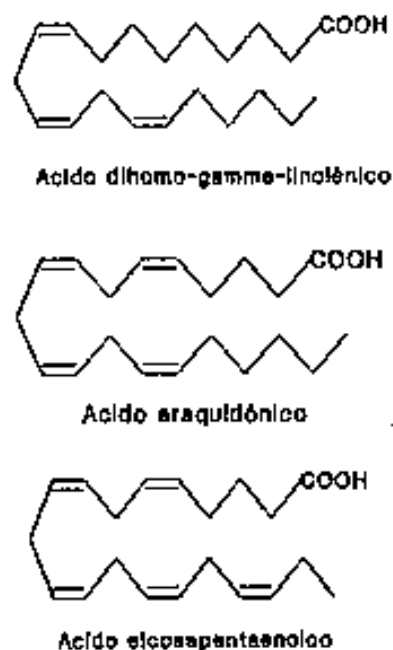


Fig. 1.4.2.

La revisión de la síntesis de eicosanoides que se efectúa a continuación se refiere tan sólo a las vías de la ciclooxigenasa y las lipoxigenasas, puesto que la información existente sobre las vías metabólicas del AA en las que puede intervenir el citocromo P-450 (con actividad enzimática epoxigenasa, y posiblemente monooxigenasa y lipoxigenasa(s) y sobre la relevancia biológica de los productos de la epoxigenasa, es escasa aunque creciente [196].

1.4.1. LIBERACIÓN DEL ACIDO ARAQUIDONICO.

La primera etapa de la biosíntesis de los eicosanoides es la liberación del AA a partir de los glicerofosfolípidos de membrana. Normalmente las células producen escasa cantidad de eicosanoides, y los aumentos en la producción de los mismos en respuesta a diversos estímulos se correlacionan con la liberación de AA, lo que

sugiere que este primer paso es un punto importante de control.

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso de cadena larga, con 20 átomos de carbono (de donde procede el prefijo "eicosa-") y cuatro dobles enlaces (ácido 5,8,11,14 eicosatetraenoico). En la mayoría de las células, la concentración de AA libre es muy baja, y el AA debe ser liberado de

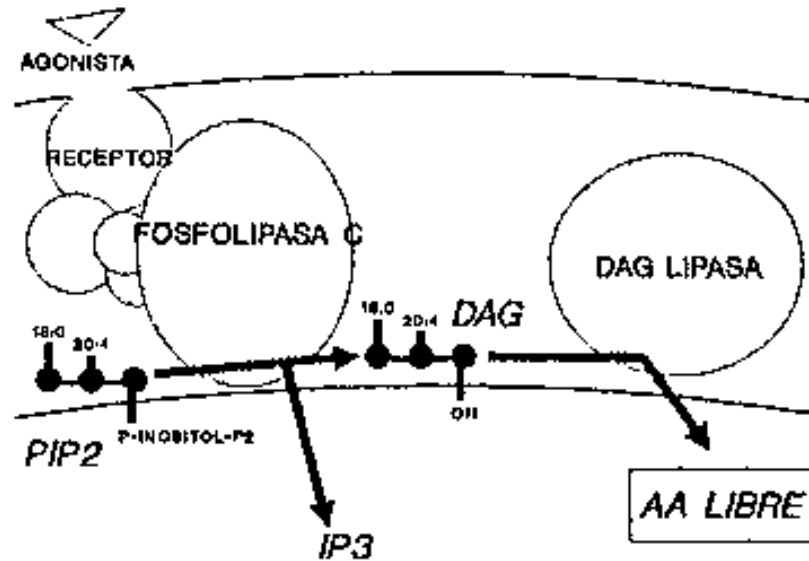


Fig. 1.4.3

los glicerofosfolípidos de membrana, en los que se encuentra esterificado en su mayor parte, antes de que puede ser metabolizado por las diferentes vías que dan lugar a los prostanoídes y eicosanoídes.

Los mecanismos exactos de la liberación del AA no se conocen en su completo detalle. Multitud de estímulos son capaces de inducir la liberación de AA, ya sea de forma mediada por receptores celulares (hormonas, autacoides, factores de crecimiento y promotores tumorales) o no (estímulos físicos). La liberación de AA se produce de forma rápida (es decir, en 5 a 60 segundos) y se acompaña típicamente de una activación del metabolismo de los polifosfatos de inositol. De hecho, parte del AA que se utiliza para la síntesis de eicosanoídes podría derivar de la hidrólisis secuencial de los fosfoinosítidos por la fosfolipasa C y la diacilglicerol lipasa (Fig. 1.4.3); sin embargo, las fuentes principales de AA

libre son probablemente los glicerofosfolípidos más abundantes, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y el enzima clave es la fosfolipasa A_2 (Fig. 1.4.4) [197].

Las diversas fosfolipasas actúan hidrolizando los fosfoglicéridos de membrana en determinados puntos de sus moléculas, y poseen cierta especificidad de sustrato. La fosfolipasa C da lugar a la liberación de inositol-trifosfato y diacilglicerol, que actúan como segundos mensajeros en la transducción de las señales que regulan el funcionamiento celular; sin embargo, el diacilglicerol puede dar lugar a AA, contribuyendo en cierto grado a la síntesis de prostanoides y eicosanoides [155].

La fosfolipasa A_2 es el enzima más importante en cuanto a la liberación de AA, y su actividad es el paso limitante de la cascada del AA [198,199]. La fosfolipasa A_2 se encuentra en la piel asociada a la fracción de membrana plasmática [200], aunque también se ha descrito asociada a los lisosomas [201].

La fosfolipasa A_2 es un enzima dependiente de Ca^{2+} , cuyo origen es principalmente intracelular [202], y su actividad se ve modulada por acción de diversas cinasas, en especial la calmodulina-cinasa [203]. Se ha propuesto otro mecanismo de control en relación con la metilación enzimá-

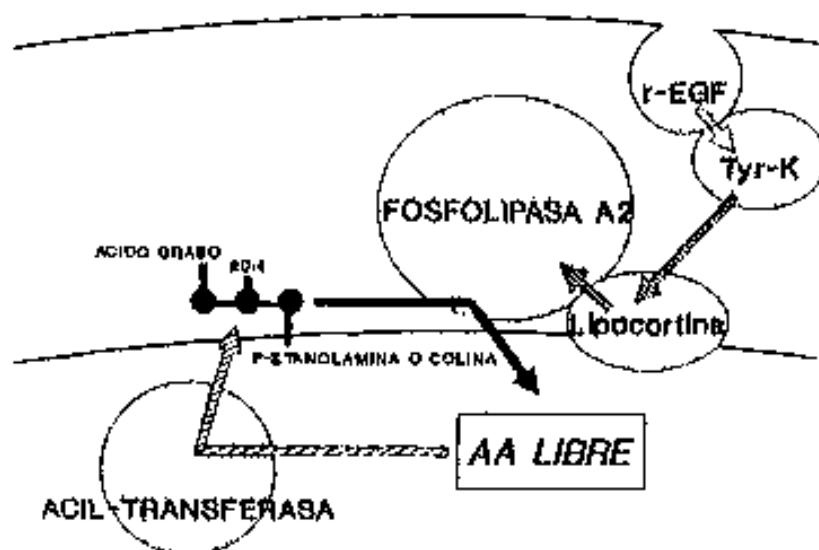


Fig. 1.4.4

tica de los fosfolípidos, que aumentaría la fluidez de la membrana celular y facilitaría la accesibilidad de la fosfolipasa A_2 a sus substratos, aumentando la liberación de AA libre [204].

La lipocortina es una proteína de 40 Kd cuya síntesis es inducida por los corticosteroides, y constituye el "segundo mensajero" en el efecto antiinflamatorio de los corticosteroides a través de la inhibición de la fosfolipasa A_2 [205,206]. La actividad antifosfolipasa A_2 de la lipocortina viene determinada por su grado de fosforilación [207], de forma que en los neutrófilos la tasa de liberación de AA se correlaciona con la cantidad de lipocortina fosforilada. Este mecanismo de fosforilación es dependiente de la actividad de la proteína-quinasa (tirosina-quinasa) asociada al receptor para EGF [165].

Recientemente se ha identificado una nueva fosfolipasa A_2 en la porción superior de la epidermis y la capa córnea [164,208], cuya actividad no se modifica con el pretratamiento con corticosteroides, lo que indica que no es controlada por la lipocortina. La distribución de este enzima sugiere que puede intervenir en la hidrólisis de fosfolípidos que acompaña a la queratinización, pero no se sabe todavía si también es capaz de iniciar la liberación de eicosanoides pro-inflamatorios.

Una vez liberado, el AA puede ser reesterificado e incorporado a los fosfolípidos de la membrana celular; esta reacción, catalizada por una acil-transferasa, también contribuye a determinar los niveles de AA libre disponible para la síntesis de eicosanoides [209]. La reesterilación puede determinar en gran medida los niveles de AA libre (y metabolizable) en la situación de "reposo" celular, si bien es poco probable que tenga un efecto relevante en situaciones patológicas tales como la inflamación, en las que los niveles de AA libre sean elevados debido a la activación de la fosfolipasa.

1.4.2. METABOLIZACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO

El otro destino posible del AA libre es que constituya un sustrato a disposición de la dotación enzimática de la célula y sea metabolizado por una de las vías de la cascada del AA (ciclooxigenasa, 5-, 12- y 15-lipoxigenasa), lo que equivale a su oxidación en diversos puntos de la cadena de 20 átomos de carbono. El bloqueo de una de las vías metabólicas del AA puede determinar un aumento de producción, "por rebosamiento", de los metabolitos de las demás vías.

1.4.2.1. CICLOOXIGENASA.

Las prostaglandinas (PG) constituyen una familia de compuestos derivados de los ácidos grasos insaturados. Su descubrimiento y el conocimiento de su bioquímica han dado lugar a grandes avances en farmacología y medicina clínica. En 1930 Kurzok y Lieb [210], dos ginecólogos de Nueva York, describieron la acción mioconstrictora del líquido seminal en el útero humano. A mediados de la década de los 30, Goldblatt [211] en Inglaterra y von Euler [212] en Suecia describieron independientemente algunas de las acciones del plasma seminal sobre el músculo liso. Debido a la procedencia del material, a partir del líquido seminal y de extractos lipídicos de las glándulas vesiculares del cordero, von Euler acuñó el término "prostaglandinas", una denominación inapropiada que ha persistido hasta la actualidad, pese a que sabemos que estas sustancias se encuentran presentes en la mayor parte de tejidos y fluidos biológicos, y tienen una especial importancia en la fisiología y fisiopatología de la piel.

Las prostaglandinas son ácidos grasos cíclicos que contienen 20

átomos de carbono, cuyo esqueleto está formado por un anillo de ciclopentano y dos cadenas laterales alifáticas. Las prostaglandinas difieren entre sí por el grado de insaturación y las sustituciones presentes en el anillo de ciclopentano y las cadenas laterales alifáticas. Se conocen nueve grupos bien definidos de prostaglandinas, que se denominan con las letras A a I, y se caracterizan por la presencia de diversos grupos funcionales en el esqueleto de 20 átomos de carbono.

La ciclooxigenasa introduce dos moléculas de oxígeno en la molécula de AA a nivel de C-11 y C-15. Por isomerización y ciclización se forma un metabolito intermedio inestable, el endoperóxido cíclico PGG₂ [213], cuyo grupo 15-hidroperoxi (-OOH) sufre una excisión reductora, dando lugar a PGH₂ (Fig. 1.4.2.1.1) [214].

La conversión del AA en PGH₂ viene determinada por la acción de la PGG/H sintetasa, una proteína de membrana integral que se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico celular. Este enzima parece ser un dímero compuesto de dos subunidades idénticas y posee las dos actividades catalíticas diferenciadas que se han mencionado en el anterior párrafo: una bisoxigenasa (ciclooxigenasa) que interviene en la for-

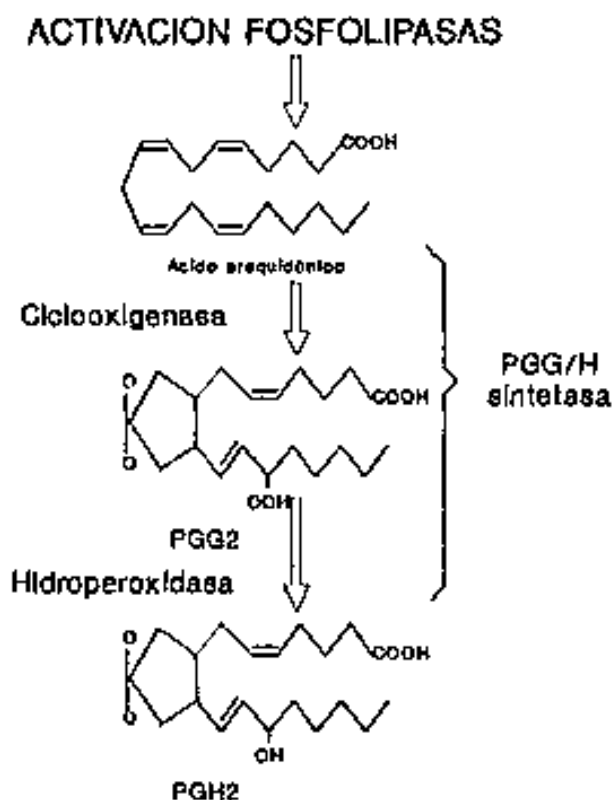


Fig. 1.4.2.1.1. Vía de la ciclooxigenasa.

mación de PGG_2 y una hidroperoxidasa que cataliza la reducción neta de dos electrones del grupo 15-hidroperoxilo de la PGG_2 dando lugar a PGH_2 . Ambas actividades requieren la presencia del grupo hemo. La actividad de la ciclooxigenasa, pero no la de la hidroperoxidasa, es inhibida de forma específica por la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos. Como consecuencia de la exposición a la aspirina, se acetila un residuo específico de serina, lo que determina una inhibición irreversible de la ciclooxigenasa, por lo que se requiere nueva síntesis del enzima para que se produzcan más prostanoideas. La indometacina, el meclofenamato y el flurbiprofén también causan una inactivación irreversible de la ciclooxigenasa sin que aparentemente se produzca una modificación covalente del enzima. Otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos de uso habitual en clínica, tales como el ibuprofén, el ácido flufenámico y el sulindac son inhibidores reversibles del enzima que compiten por la unión con el AA [197].

La síntesis de PGG/H sintetasa se ve influida en diversos sistemas celulares y orgánicos por los esteroides, factores de crecimiento y promotores tumorales que inducen la expresión de protooncogenes, por lo que se considera uno de los enzimas importantes regulados por el ciclo celular [197].

El endoperóxido PGH_2 ocupa una posición central como metabolito intermediario en la biosíntesis de prostanoideas (prostaglandinas y tromboxanos) (Fig. 1.4.2.1.2), al ser el sustrato para las isomerasas de endoperóxidos E [215] y D [216], que dan lugar a la formación de PGE_2 y PGD_2 , en presencia de glutatión reducido. En cambio, la $PGF_{2\alpha}$ probablemente proceda de una reducción no enzimática del sustrato inestable, si bien existen evidencias de la posibilidad de una conversión de PGE_2 a $PGF_{2\alpha}$ a través de una 9-ceto reductasa, que se encuentra en la fracción celular soluble, requiere NADPH como cofactor, se ha identificado en homogenados de piel humana, y podría estar activada en situaciones de hiperpro-

liferación epidérmica tales como la psoriasis [217]. La PGI_2 y la $PGF_{2\alpha}$ pueden originarse en proporciones variables a partir de la PGH_2 por otros dos mecanismos, a saber: su hidrólisis no enzimática en lípidos acuosos, favorecida por la presencia de factores inespecíficos y proteínas tales como la albúmina [218] y la actividad de la glutatión-transferasa [216].

La tromboxano-sintetasa [219] y la prostaciclina-sintetasa [220] catalizan la producción de dos productos inestables, el tromboxano A_2 (TXA_2) y la prostaciclina (PGI_2), que se reordenan espontáneamente (de forma no enzimática) para dar lugar a sus metabolitos estables e inactivos, el TXB_2 y la 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$ respectivamente.

La PGH_2 se descompone de forma no enzimática en malonildialdehído y ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico (HHT), que constituye por consiguiente un buen indicador de la actividad global de la ciclooxigenasa en un determinado tipo celular, si bien en algunas ocasiones el HHT representa un producto alternativo de la descomposición del TXA_2 , aparte de la transformación en TXB_2 [221] o bien de la propia síntesis de TXA_2 por la tromboxano-sintetasa, a la que se unirían dos moléculas de PGH_2 , dando lugar a una molécula de TXA_2 y una de HHT [222].

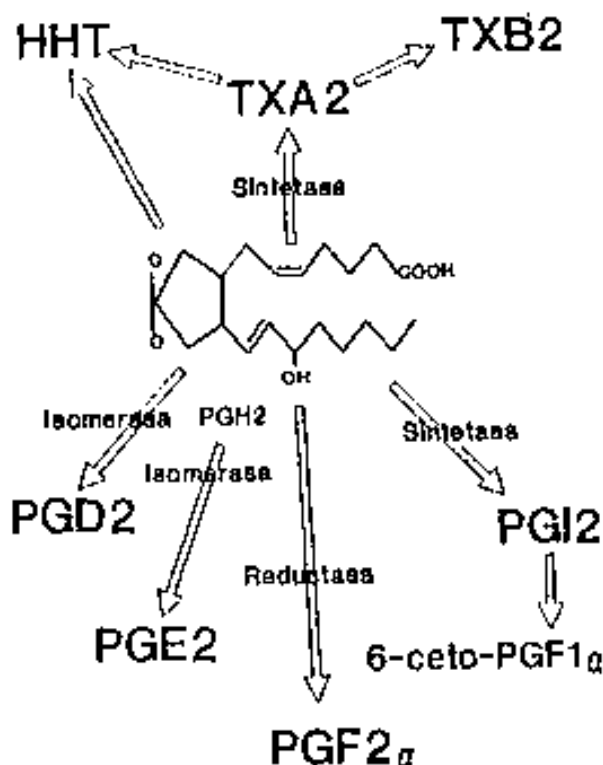


Fig. 1.4.2.1.2. Síntesis de prostanoideos y tromboxanos.

Los prostanoideos biológicamente activos, que se considera que son la PGI_2 , la PGF_2 , la $PGF_{2\alpha}$, la PGI_2 y el TXA_2 , se sintetizan de forma específica para cada tipo celular, es decir que cada tipo de célula productora de prostanoideos tiende a formar sólo uno de estos compuestos como producto principal [197].

1.4.2.2. LIPOXIGENASAS.

El AA puede ser metabolizado por las lipoxigenasas, que se denominan, según el número del átomo de carbono sobre el que actúan, como 5-, 12- y 15-lipoxigenasa, así como por otros enzimas, dando lugar a los leucotrienos y diversos productos mono-, di- y tri-hidroxiácidos grasos. Samuelsson et al. [223] han proporcionado una visión integrada de estas vías metabólicas. En síntesis, existen tres lipoxigenasas diferentes en los mamíferos que catalizan la inserción de oxígeno molecular en las posiciones 5, 12 o 15. El producto inicial de cada una de estas reacciones es un ácido hidroperoxico-satetraenoico (5-, 12- o 15-HPETE), que puede reducirse dando el correspondiente ácido hidroxico-satetraenoico (5-, 12- o 15-HETE) (Fig.1.4.2.2.1).

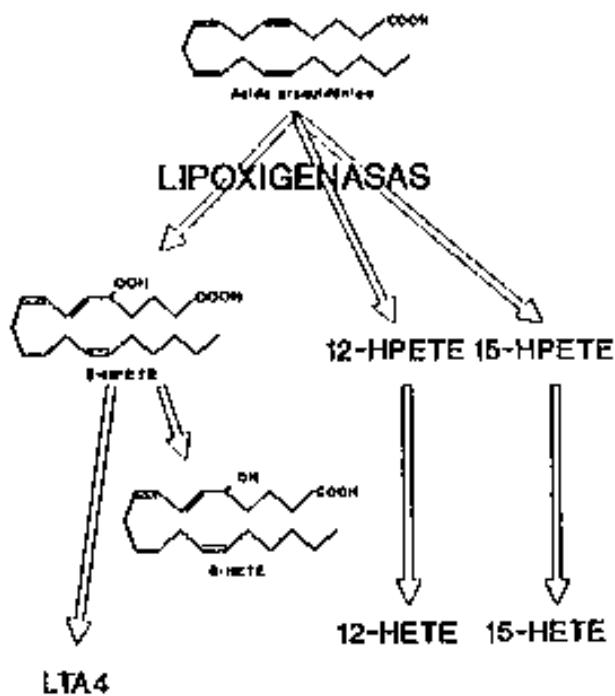


Fig. 1.4.2.2.1. Vía de las lipoxigenasas.

La 12-lipoxigenasa transforma

ma el AA en 12-HPETE, que posteriormente es reducido a 12-HETE [224]; esta reducción está catalizada por una peroxidasa dependiente de glutatión que requiere selenio en el centro activo [225].

La 15-lipoxigenasa se encuentra activa en los leucocitos, fibroblastos y queratinocitos humanos, entre otros tipos celulares, y participa, junto con la 5-lipoxigenasa, en la formación de las lipoxinas, cuya actividad biológica aún no ha sido completamente elucidada [223].

La vía de la 5-lipoxigenasa ha sido la que ha recibido una mayor atención por estar implicada en la formación de los leucotrienos, que son los eicosanoides cuya actividad biológica es más potente; se aplica la denominación de "leucotrienos" [226] a los compuestos con un grupo trieno conjugado producidos en los leucocitos por esta vía metabólica (Fig. 1.4.2.2.2).

El primer paso en la biosíntesis de leucotrienos consiste en la movilización del ácido graso poliinsaturado precursor a partir de los fosfolípidos de la membrana celular. Empleando otros ácidos grasos poliinsaturados se pueden formar análogos estructurales de los leucotrienos: el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico y el ácido 5,8,11-eicosatrienoico dan lugar a la formación de leucotrienos de las series LTC₅ y LTC₄, respectivamente [227,228].

Recientemente se han esclarecido algunos aspectos del mecanismo de acción de la 5-lipoxigenasa, que es un enzima citosólico dependiente de Ca²⁺ que en situación experimental puede activarse directamente por la adición de AA exógeno, a través un mecanismo en el que interviene una proteína G [229] o bien por acción del ionóforo de Ca²⁺ A23187. La activación por el ionóforo A23187 de la 5-lipoxigenasa en los leucocitos humanos procedentes de sangre periférica determina, en la célula intacta, la translocación del enzima a la

membrana celular y su ulterior inactivación mediante la acción de una proteína [230,231] que se puede inhibir específicamente [232].

El ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE) se identificó como el principal producto de la incubación de PMN neutrófilos con AA [233]. El 5-HETE deriva de la reducción del ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico (5-HPETE), que a su vez puede ser sometido a la formación de un epóxido, que da lugar al metabolito intermedio inestable leucotrieno A₄ (LTA₄; ácido 5,6-oxidoeicosatetraenoico) [234]. El LTA₄ da lugar por hidrólisis enzimática al LTB₄, mientras que la conjugación del epóxido con glutatión, por medio de la glutatión-S-transferasa, da lugar a LTC₄ (ácido 5-hidroxi-6-S-glutacionil-7,9,11,14-eicosatetraenoico), que puede verse sometido ulteriormente a peptidólisis secuencial, que da lugar a LTD₄ y LTE₄; estos tres compuestos constituyen lo que se conocía anteriormente como slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) [235]. La eliminación del residuo glutámico terminal por parte de la gamma-glutamyl-transpeptidasa (γ-GGT) da lugar a la formación de LTD₄, y la acción de una dipeptidasa, eliminando el residuo glicilo, da lugar finalmente al LTE₄ [236].

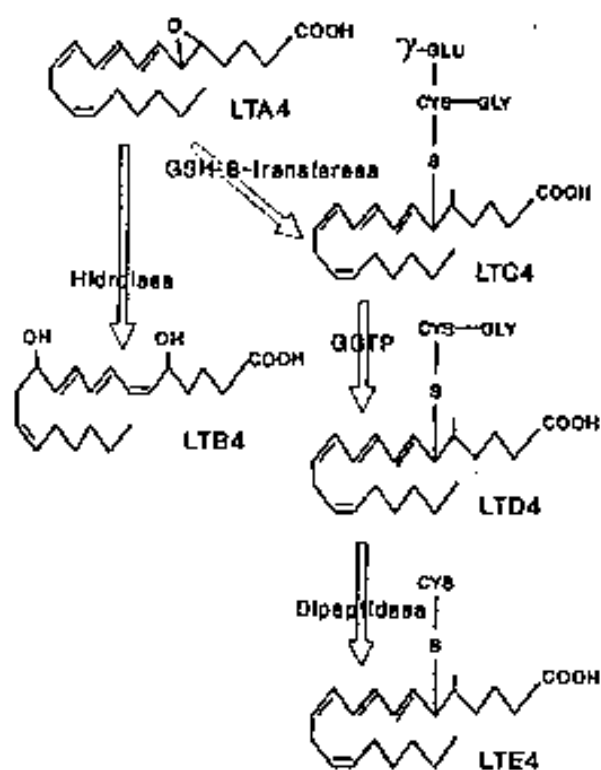


Fig. 1.4.2.2.2. Síntesis de leucotrienos.

1.5. EVIDENCIAS DEL PAPEL FISIOPATOGENICO DE LOS EICOSANOIDES EN LA PSORIASIS

Existen evidencias clínicas y experimentales que sugieren la intervención de los leucotrienos como mediadores en diversas dermatosis, tales como la dermatitis de contacto [142], la pitiriasis rubra pilaris [237], la celulitis eosinofílica [238], las reacciones alérgicas cutáneas en atópicas [239], la dermatitis atópica [149,240], la incontinencia pigmenti [241], la erupción polimorfa lumínica [242] o el penfigoide ampolloso [243].

Sin embargo, la psoriasis constituye la dermatosis mejor estudiada desde este punto de vista. La demostración del papel fisiopatogénico de los eicosanoides en la psoriasis requiere, al igual que ocurre en el caso de cualquier otro mediador fisiopatológico, el cumplimiento de los postulados de Dale [244]:

1. Los eicosanoides deben hallarse en concentraciones elevadas, y deben demostrarse mecanismos para su producción, en la piel afectada.
2. Deben ser capaces de producir experimentalmente efectos patológicos similares a los que se observan en la enfermedad.
3. La administración de antagonistas o inhibidores específicos de la síntesis de eicosanoides debe tener eficacia terapéutica.

1.6. NIVELAS ELEVADOS DE EICOSANOIDES EN LAS LESIONES DE PSORIASIS.

Ya en 1975 se demostró la presencia de concentraciones elevadas de AA libre, 12-HETE, PGE₂ y PGF_{2α} en homogeneizados procedentes de epidermis lesional psoriásica, con respecto a la procedente de áreas no afectas y de piel normal [141]. Posteriormente se ha

confirmado repetidamente la presencia de concentraciones elevadas de AA y sus metabolitos, principalmente eicosanoides producidos por las vías de la 12- y la 5-lipoxigenasa, tales como 12-HETE, LTB₄, LTC₄ y LTD₄ [142-149,245,246], pero también por la vía de la 5-lipoxigenasa, como 15-HETE [144,151] y ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE) [144,151], así como 11-HETE, 9-HETE, 8-HETE, 5-HETE, 13-HODE, 9-HODE y ácido 15-hidroxi-eicosadienoico (15-HEDE), identificados en un estudio mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas previa separación por HPLC [144].

Sin embargo, aún no se ha dilucidado completamente el origen celular de estos compuestos, como consecuencia fundamentalmente de diferencias metodológicas. En el caso de la psoriasis, se han obtenido muestras a partir de escamas procedentes de lesiones [144,145,148,246], trasudado procedente de abrasiones cutáneas y recogido en cámaras de plástico, e. ocasiones adheridas con cianoacrilato [143,144,145-148,247], en el contenido líquido de ampollas inducidas por succión [149], o bien en muestras homogeneizadas o pulverizadas, por lo general previa congelación, procedentes de biopsias cutáneas obtenidas mediante queratotomo [141,151,245].

Por consiguiente, es difícil evaluar la contribución de las células epidérmicas intactas, al igual que la de otros componentes celulares de las lesiones psoriásicas, tales como los PMN o mononucleares presentes en la epidermis en diversos estadios de las lesiones, fibroblastos o células endoteliales de la microvasculatura dérmica, o bien del contenido celular de la sangre circulante por los vasos sanguíneos dilatados presentes en la dermis psoriásica.

1.7. METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LOS COMPONENTES CELULARES PRESENTES EN LA PIEL NORMAL Y EN LAS LESIONES DE PSORIASIS.

1.7.1. QUERATINOCITOS.

A fin de estudiar la contribución de los queratinocitos a la biosíntesis de los metabolitos del AA, se han empleado cultivos de queratinocitos y suspensiones de células epidérmicas. Sin embargo, estos modelos experimentales no carecen de dificultades metodológicas.

Numerosos investigadores han estudiado el metabolismo del AA en cultivos de queratinocitos [248-266]. La mayoría de los trabajos se han efectuado empleando cultivos primarios de queratinocitos murinos [248-251,255,264] o humanos [253,254,256-260], así como líneas celulares de queratinocitos de rata [267], aunque algunos autores han trabajado con suspensiones de células epidérmicas recién obtenidas [265,268-271]. También se han empleado preparaciones subcelulares de queratinocitos de ratón [250], humanos [257], o de cobaya [272,273].

Por otra parte, las determinaciones analíticas de los metabolitos del AA se han efectuado por diversos medios. En consecuencia, no es de extrañar que los resultados hayan sido frecuentemente variables. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que los productos predominantes de la ciclooxigenasa en los cultivos de queratinocitos son la PGE_2 y la $PGF_{2\alpha}$ [248,252-255,261,262], existe cierto desacuerdo por lo que respecta a otros productos de la ciclooxigenasa (PGI_2 , PGD_1 , TXA_2) [252,261,262]. También se han observado diferencias apreciables en cuanto a la producción de los derivados de las lipoxigenasas, desde un predomi-

nio del 15-HETE, con producción de leucotrienos prácticamente nula [256,257], hasta un predominio de 12-HETE, con escasa producción de 15-HETE [260].

En los estudios efectuados con suspensiones o cultivos de queratinocitos, es muy importante descartar la contaminación por fibroblastos procedentes de la dermis, pues se ha demostrado la producción de metabolitos del AA por parte de los fibroblastos, con posibles efectos hiperproliferativos sobre éstos, así como la posible interacción de los fibroblastos sobre los queratinocitos, modulando el metabolismo del AA en éstos [261,262].

La producción de prostanooides por parte de los queratinocitos puede también ser modulada por las condiciones de cultivo, habiéndose demostrado que la presencia de concentraciones bajas de Ca^{2+} (0.02-0.09 mM) (que determinan una situación hiperproliferativa y de menor diferenciación de los queratinocitos en cultivo) estimula la síntesis de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ y altera la respuesta del metabolismo del AA frente a estímulos tales como el ionóforo A23187 o el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato [264]. Estos resultados corroboran las observaciones de una relación entre la producción de PGE_2 y la proliferación de los queratinocitos [253-255]. Sin embargo, también se ha observado que la pCO_2 del medio modifica cuantitativamente la síntesis de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$, pero no la síntesis de ADN [254].

Por otra parte, diversos autores han estudiado recientemente el efecto de diversos estímulos del metabolismo del AA (tales como el epidermal growth factor, el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato, un análogo del diacilglicerol que activa directamente la proteína-quinasa C, o la radiación ultravioleta B, en líneas de cultivo de queratinocitos de rata [267] y suspensiones de queratinocitos de ratón [265], con resultados discordantes.

Sin embargo, el metabolismo del AA en los cultivos de queratinocitos procedentes de la epidermis de animales de experimentación puede que no sea comparable con el de los cultivos celulares de origen humano.

Se ha descrito que los cultivos de queratinocitos humanos producen un material semejante al LTB_4 (determinado mediante ensayos de actividad quimiocinética) [260] y 5-HETE [259], en cantidades variables, dependientes de la concentración de Ca^{2+} en el medio y la densidad celular del cultivo [274] y que son capaces de metabolizar el LTB_4 mediante ω -oxidación y ω -carboxilación [275]. Sin embargo, el metabolismo del AA por parte de las células en cultivo puede no ser comparable al que tiene lugar en las condiciones fisiológicas de crecimiento, diferenciación y estructura tisular de la epidermis. Por otra parte, debe tenerse en cuenta la posible influencia de los eicosanoides generados por el lecho nutricional de fibroblastos murinos 3T3, que conservan su capacidad de biosíntesis de PGE_2 y $\text{PGF}_{1\alpha}$ pese al tratamiento con mitomicina C [263], lo que podría explicar su efecto promotor del crecimiento de los queratinocitos [253].

Los estudios del metabolismo del AA en suspensiones de células epidérmicas humanas [268-271,276] se han efectuado empleando piel sana de adulto (intervenciones de cirugía plástica) o recién nacido (prepuccio) obtenida mediante un acto quirúrgico, que por lo general se somete a una separación mecánica de la epidermis y la dermis, y a una tripsinización en frío o a 37°C. Los estudios efectuados hasta el momento han demostrado la producción de 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, así como pequeñas cantidades de LTB_4 , 20-OH- LTB_4 y compuestos no identificados [145,266], o bien 12-HETE y pequeñas cantidades de LTB_4 [269], o bien, en queratinocitos de recién nacido, principalmente 12-HETE, 15-HETE y PGE_2 [270], o bien 12-HETE, 15-HETE (con el mayor porcentaje de producción en forma de enantiómeros (S), en contraste con lo que ocurre en la psoriasis), 12,20-

diHETE, LTB₄, PGE₂ y PGF_{2α} [271]. En el estudio más reciente [276] se ha cuantificado la producción de metabolitos del AA por suspensiones de células epidérmicas humanas, observándose que el 12-HETE y la PGE₂ son los principales productos del metabolismo del AA, produciéndose menores cantidades de 15-HETE, PGF_{2α}, PGD₂ y ácido 8,9-epoxicoicosatrienoico; la proporción de los estereoisómeros R y S del 12-HETE y 15-HETE sintetizado sugiere que los queratinocitos poseen una monooxigenasa ligada a la membrana, pendiente de caracterización. Por lo que respecta a los metabolitos de la 15-lipoxigenasa, 15-HETE (procedente del AA) y ácido 13-hidroxi-9,11-octadecadienoico (13-HODE) (procedente de la oxidación del ácido linoleico), proceden de la actividad de la 15-lipoxigenasa presente en los queratinocitos humanos [256,277] y que se activa en condiciones de lesión celular durante el procesamiento de las muestras [278].

Entre las variables que pueden influir en la diversidad de resultados de los estudios analíticos revisados, se deben tener en cuenta la edad de los donantes, la región del cuerpo de donde se obtienen las muestras, las características técnicas del proceso quirúrgico mediante el que se obtienen las muestras, la duración del período de isquemia en frío previo al procesamiento de las muestras, la contaminación de la epidermis por células de otra procedencia (sangre o dermis), o la lesión celular secundaria al procesamiento de las suspensiones celulares o la adición de sustancias citotóxicas (solubilizadoras de la membrana celular) a fin de detener la reacción o de extraer los eicosanoides mediante disolventes.

1.7.2. FIBROBLASTOS.

Por lo que respecta al metabolismo de los fibroblastos humanos en cultivo, existen diferencias según el órgano de procedencia; los

fibroblastos procedentes de pulmón producen TXA_2 y PGE_2 , mientras que en los procedentes de piel la PGE_2 es el producto mayoritario [279,280]. Estos hallazgos han sido posteriormente confirmados y extendidos, demostrándose que la PGE_2 es el producto mayoritario en los cultivos de fibroblastos humanos de origen dérmico, detectándose cantidades menores de 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 y PGA_2 como derivados de la actividad de la ciclooxigenasa, y habiéndose descrito la formación de productos monohidroxilados: HHT, 15-HETE y 11-HETE, en cantidades comparables a las de las prostaglandinas minoritarias [281].

1.7.3. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

La presencia de concentraciones elevadas de productos de la ciclooxigenasa, y en especial de la 5- y la 12-lipoxigenasa (principalmente 12-HETE y LTB_4) sugiere que la producción de eicosanoides por los tipos celulares de origen no epidérmico presentes en la epidermis, tales como los PMN, pueda ser importante.

El AA es metabolizado por la 5-lipoxigenasa de los PMN dando lugar a 5-HPETE, que es en parte reducido a 5-HETE y en parte convertido a LTA_4 . Este a su vez puede ser sometido a una transformación enzimática, dando lugar principalmente a LTB_4 y péptidoleucotrieno. El LTA_4 es el intermediario común a la biosíntesis de leucotrienos, y puede convertirse de modo no enzimático en dos isómeros

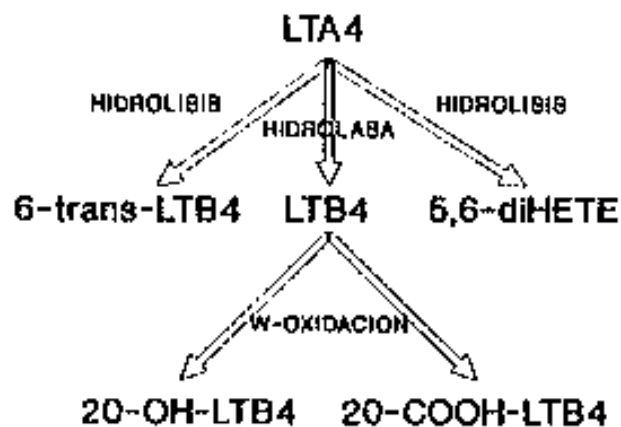


Fig. 1.7.3.1. Metabolismo del LTA_4 .

del LTB_4 : el 6-trans- LTB_4 y el 6-trans-12-epi LTB_4 , así como en los dos epimeros 5,6-dihETE [236]. El LTB_4 es sometido a ω -oxidación en los PMN. Este sistema enzimático, semejante al citocromo P450 [282], da lugar a 20-hidroxi- LTB_4 (20-OH- LTB_4), que en un segundo paso es oxidado a 20-carboxi- LTB_4 (20-COOH- LTB_4) (Fig. 1.7.3.1).

La presencia de niveles elevados de productos de la 5-lipoxigenasa, tales como el LTB_4 , y la relevancia de sus efectos biológicos con respecto a la fisiopatología de la psoriasis, ha llevado a diversos autores [283-287] a investigar las posibles alteraciones del metabolismo del AA en los PMN de los pacientes psoriásicos. Existen ciertas discrepancias en los resultados de los diversos estudios por lo que respecta a la actividad de la 5-lipoxigenasa y la capacidad ω -oxidativa de los PMN procedentes de pacientes psoriásicos.

Ruzicka et al. [283] llegaron a la conclusión de que no existe un aumento en la actividad de la vía de la 5-lipoxigenasa en los PMN-circulantes en la psoriasis. Estos autores determinaron los niveles de LTB_4 y 5-HETE presentes en el medio de suspensiones de PMN procedentes de veinte pacientes psoriásicos, tras la estimulación con A23187 $10 \mu\text{M}$ previa incubación con ^{14}C -AA $1.9 \mu\text{M}$ durante 10 min. El análisis de la formación de productos de la ω -oxidación se efectuó de modo aproximado. Dadas las condiciones experimentales empleadas por estos autores, es poco probable que pudieran apreciar diferencias en la tasa de biosíntesis de productos de la 5-lipoxigenasa, debido a las bajas concentraciones de sustrato y la prolongada duración de los tiempos de incubación. Por otra parte, estos autores no tuvieron en cuenta la retención de los eicosanoides formados por parte de las propias células, ni las transformaciones no enzimáticas del LTA_4 .

Maurice et al. [284] estudiaron el metabolismo del AA endógeno en

suspensiones de PMN procedentes de 19 pacientes psoriásicos. Estos autores evaluaron la formación de LTB_4 , 6-trans- LTB_4 , 6-trans-12-epi- LTB_4 y 5-HETE, sin tener en cuenta los productos de la ω -oxidación del LTB_4 , tras la incubación de PMN con A23187 $3.8 \mu\text{M}$ durante 5 min. Los resultados de estos autores, que no hallaron diferencias entre los grupos de psoriásicos y control, concuerdan con los de Ruzicka et al. [283].

Maurice et al. [285] estudiaron asimismo el metabolismo del AA en suspensiones mixtas de leucocitos y plaquetas, procedentes de individuos psoriásicos y normales. A tal fin, estos autores incubaron preparaciones celulares mixtas durante 5 minutos con ^{14}C -AA $3.4 \mu\text{M}$. En las condiciones experimentales que emplearon, no observaron la producción de productos de la 5-lipoxigenasa, mientras que el principal eicosanoide producido fue identificado como 12,20-diHETE. La formación de 12,20-diHETE fue significativamente mayor en el grupo de psoriásicos. Este hallazgo condujo a los autores del trabajo a postular que los PMN procedentes de los pacientes psoriásicos ω -oxidaban más eficazmente el 12-HETE producido por las plaquetas. Sin embargo, la complejidad de su diseño experimental hace difícil obtener conclusiones de sus resultados.

Stüning et al. [287] estudiaron el curso temporal de la producción de LTB_4 y sus productos de ω -oxidación por parte de los PMN procedentes de individuos psoriásicos y normales, incubando suspensiones de PMN con ^{14}C -AA $2.8 \mu\text{M}$ y A23187 $5.7 \mu\text{M}$. Estos autores observaron ligeras diferencias en la cantidad de LTB_4 producido en función del tiempo, así como un aumento significativo en la producción de productos de la ω -oxidación del LTB_4 por parte de los PMN procedentes de pacientes psoriásicos, en todos los tiempos de incubación. Estos resultados parecen confirmar los de Ruzicka et al. [283] y Maurice et al. [284,285].

Maurice et al. [286] también estudiaron la formación de LTB_4 y sus metabolitos ω -oxidados en suspensiones de PMN procedentes de 14 pacientes psoriásicos y 13 individuos normales, tras la estimulación con A23187 3.8 μM durante 5 min. En este estudio no se hallaron diferencias en cuanto a los niveles de LTB_4 , si bien los PMN procedentes de pacientes psoriásicos sintetizaron una mayor cantidad de productos de la ω -oxidación. En este trabajo también se estudió el curso temporal de la síntesis de LTB_4 y sus metabolitos ω -oxidados por parte de los PMN procedentes de 4 pacientes psoriásicos y 3 controles, confirmando los resultados previos de los mismos autores. A fin de determinar las constantes cinéticas de la ω -oxidación, estos autores incubaron con LTB_4 radioactivo exógeno suspensiones de PMN procedentes de 3 pacientes psoriásicos y 3 controles, no observando diferencias significativas en cuanto a los niveles de 12-HETE. Maurice et al. [286] explican los mayores niveles de 12,20-dihETE observados en las incubaciones de PMN procedentes de pacientes psoriásicos, observadas en su trabajo previo [285] en base a un aumento en la producción de 12-HETE por parte de las plaquetas de los pacientes psoriásicos. Esta explicación no concuerda con el hecho de que la suma de la producción de 12-HETE y 12,20-dihETE fue prácticamente igual en el grupo de psoriásicos que en el grupo control.

Los resultados de estos autores constituyen evidencias experimentales algo contradictorias de la existencia de diferencias en cuanto al metabolismo del AA por parte de los PMN procedentes de pacientes psoriásicos con respecto a los procedentes de individuos control. Sin embargo, no queda claro que estas diferencias estén en relación con la actividad de la 5-lipoxigenasa o con el catabolismo del LTB_4 . En ninguno de los estudios anteriormente citados [149,284-287] se ha determinado el metabolismo total del AA por parte de la 5-lipoxigenasa.

1.7.4. PLAQUETAS.

Existen evidencias de la presencia de alteraciones plaquetares en los pacientes psoriásicos. En un estudio retrospectivo se observó una mayor incidencia de enfermedad vascular oclusiva (tromboflebitis, infarto de miocardio, tromboembolismo pulmonar y accidentes cerebrovasculares) en los psoriásicos con respecto a otros pacientes dermatológicos [288]. También se ha observado la presencia de hiperviscosidad sanguínea [289] e hiperagregabilidad plaquetar [290-292] en los pacientes psoriásicos, lo que indica una situación de activación plaquetar. Recientemente se ha descrito un aumento en la producción de ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico (HHT), que indica la actividad de la ciclooxigenasa, y 12-HETE por parte de las plaquetas de pacientes psoriásicos con afectación superior al 10% de la superficie corporal [290,293], así como de 12,20-diHETE en suspensiones mixtas de PMN y plaquetas de pacientes psoriásicos [285].

Por consiguiente, la activación plaquetar y la producción de 12-HETE por parte de las plaquetas en los pacientes psoriásicos puede contribuir a la fisiopatología de la psoriasis. El origen celular del 12-HETE en la placa de psoriasis no está claro: si bien la actividad de la 12-lipoxigenasa es escasa o nula en los PMN [294], el 12-HETE es un producto mayoritario del AA tanto en la epidermis humana normal [245] como en la epidermis no afectada de los pacientes psoriásicos [295,296], así como en las plaquetas [297], si bien recientemente se han presentado evidencias de que el 12-HETE producido por las plaquetas puede ser estereoquímicamente diferente del presente en las escamas de psoriasis, que no corresponde al enantiómero 12(S) [271,298].

1.8. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS EICOSANÓIDOS DE INTERÉS DERMATOLÓGICO E IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA PSORIASIS.

Los efectos de determinados eicosanoides sobre la piel son similares a los hallazgos patológicos en la lesión psoriásica inicial. El estudio de las lesiones de psoriasis guttata demuestra que las primeras alteraciones observables en la piel clínicamente normal son la desgranulación de los mastocitos, la fenestración e hipertrofia endoteliales y la espongirosis focal de la capa basal y la porción inferior de la capa de Malpighi. En las lesiones clínicas incipientes se añade un infiltrado mixto perivascular, con exocitosis y formación de microabscesos de Munro e hiperplasia epidérmica [13]. Algunos autores [6] destacan el predominio de PNN en el infiltrado dérmico y la exocitosis epidérmica, así como el carácter secundario de la proliferación epidérmica. Se ha invocado la participación de un mecanismo inmunológico en la inducción traumática de las lesiones de psoriasis [299]. Estudios recientes demuestran la acumulación selectiva de linfocitos T OKT8⁺ (citotóxicos-supresores) [101,300] y células que expresan el antígeno HLA-DR (linfocitos activados?) [100] en la epidermis. Recientemente [105] se ha postulado un modelo fisiopatológico para la psoriasis en el que intervienen mecanismos inmunológicos; Bos [106], en una revisión del tema en la que se justifica la eficacia terapéutica de la ciclosporina, incluye la modulación de la inmunidad celular por parte de los eicosanoides como uno de los posibles mecanismos que intervienen en la patogenia de las lesiones de psoriasis.

Los eicosanoides son capaces de dar lugar a una serie de fenómenos biológicos que caracterizan o son capaces de intervenir en la fisiopatología de la psoriasis, aunque no parecen ser específicos de esta enfermedad:

1.8.1.EFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LA PIEL HUMANA.

Los efectos de los derivados de la ciclooxigenasa sobre la piel humana fueron los primeros que se estudiaron, al disponerse antes de los compuestos en forma pura. La inyección intradérmica de PGE_1 y PGE_2 a dosis inferiores a 1 μg causa vasodilatación local y formación de habones en la piel humana [301,302]. En contraste con estos efectos, la $PGF_{2\alpha}$ presenta escasa o nula actividad. La PGE_2 potencia las acciones de otros mediadores que aumentan la permeabilidad vascular cutánea [303] y tiene un efecto sinérgico con el PAF en cuanto a la formación de habones [304]. La prostaglandina I_2 , que, al igual que la PGE_2 , es un potente vasodilatador, también potencia la permeabilidad vascular debida a otros mediadores [303]. La prostaglandina D_2 , aunque es menos potente que la PGE_2 , también causa eritema uniforme (de 2 horas de duración) y formación de habón (de 1 hora de duración) tras la inyección intradérmica en piel humana [305,306]. Si bien no se ha observado evidencia alguna de sinergismo entre la PGD_2 y la histamina en la piel humana [307,308], sí se ha observado que la inyección simultánea de PGD_2 y LTB_4 es dolorosa y tiene un efecto sinérgico en cuanto a la induración y la infiltración de neutrófilos provocada por la inyección de LTB_4 [305]. En este sentido es interesante recordar que la PGD_2 es el principal eicosanoide producido por los mastocitos humanos presentes en la piel [309], y los mastocitos situados en la dermis papilar podrían intervenir en la fase precoz de la formación de lesiones de psoriasis [12,13].

La inyección intradérmica de los productos de las lipoxigenasas produce efectos diversos en la piel humana. El leucotrieno B_4 es un potente agente quimiotáctico de los neutrófilos [310]; la inyección intradérmica de LTB_4 , a dosis comprendidas entre 0.15 y 1.5 nmol, provoca la aparición de áreas eritematosas y edematosas que aparecen a los 30 minutos después de la inyección y duran por

lo menos 4 horas; el examen histopatológico demuestra un infiltrado dérmico formado por PMN [311]. La inyección intradérmica de 5 a 190 ng de LTC₄ y LTD₄ determina la aparición inmediata de eritema y habón, si bien la magnitud de la respuesta no se incrementa al emplear dosis superiores, hasta 3.7 µg [311]. En otro estudio [305] se observó que la inyección de 1.6 nmol de LTB₄ producía una respuesta transitoria de habón-eritema, seguida al cabo de 3 a 4 horas por induración caracterizada por un infiltrado dérmico compuesto principalmente por neutrófilos. La inyección de 1.0 nmol de LTC₄, LTD₄, o LTE₄ producía una respuesta de habón (de 2 horas de duración) y eritema (de 8 horas de duración). En ambos estudios se observó la presencia de palidez en el centro de los habones inducidos por la inyección intradérmica de leucotrienos, que se interpretó como secundaria a un efecto de vasoconstricción arteriolar [305] o bien a una compresión extravascular de la microvasculatura por el edema dérmico [311]. Si bien los péptidoleucotrienos tienen un efecto vasoconstrictor en la piel del cobaya [312], existen considerables diferencias en relación con la especie animal empleada [313] y no es aconsejable extrapolar los resultados obtenidos en modelos de experimentación animal al hombre. Este mismo razonamiento debe aplicarse a las observaciones de que la inyección intradérmica repetida de LTB₄ y 12-HETE produce cambios histológicos de espongiosis epidérmica y vasculitis leucocitoclástica en el cobaya [314], que aparentemente no han sido descritos en el ser humano.

Por lo que se refiere al principal metabolito de la 12-lipoxigenasa, si bien la inyección intradérmica de 5 y 40 µg de 12(S)-HETE no produce efecto clínico o histológico alguno sobre la piel humana, se han realizado experimentos de infusión intradérmica continua de 12(S)-HETE y 12(R,S)-HETE a la dosis de 5 µg en 40 µL de PBS pH 7.4 por hora durante 8 horas, empleando Ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODD) y PBS como controles [315,316]. Las

biopsias efectuadas a las 8 horas demostraron un mayor acúmulo dérmico perivascular y difuso de leucocitos neutrófilos y células mononucleares en las zonas de infusión de 12-HETE con respecto a los controles [316].

Son especialmente interesantes los resultados de los experimentos de aplicación tópica de LTB_4 y 12-HETE sobre la epidermis humana intacta [317]. La aplicación tópica de LTB_4 en cámara de Finn durante 6 horas sobre la región volar del antebrazo de voluntarios sanos, a dosis comprendidas entre 5 y 500 ng, produce una reacción persistente de tumefacción-eritema (con formación ocasional de vesículas y pústulas en algunos individuos) cuyo diámetro es proporcional a la dosis [317-320]. Dichas reacciones aparecen a las 12-24 horas de la aplicación y persisten durante varios días, dejando una pigmentación pardusca y descamación residual a los 7 días. El examen histológico de reacciones secundarias a la aplicación tópica de 50 a 100 μg de LTB_4 demuestra la formación de microabscesos intraepidérmicos de neutrófilos a las 24 horas, desapareciendo a las 48 horas. En la dermis se aprecia la aparición de un infiltrado dérmico perivascular con predominio de neutrófilos a las 24 horas, que se hace predominantemente perivascular a partir de las 48 horas [320,321]. Esta reacción podría representar un modelo farmacológico e histopatológico de los cambios inflamatorios que se producen en la psoriasis, si bien existen diversas características histopatológicas que diferencian la reacción a las 24 horas de la aplicación tópica de LTB_4 de la lesión establecida de psoriasis. En el primer caso, no se observa acantosis, la capa granulosa está intacta, y la capa córnea suprayacente es normal, si bien la capa granulosa está ausente en las biopsias obtenidas a las 48 y 72 horas. Por otra parte, a las 24 horas las células inflamatorias presentes en el infiltrado epidérmico son casi exclusivamente PNN, mientras que en la psoriasis se observa un número significativo de células linfomononucleares [9]. Finalmente, tampoco se observa espongirosis epidérmica en las reacciones al

LTB₄, a diferencia de lo que ocurre en las lesiones de psoriasis pustulosa.

La aplicación tópica de 12-HETE en las mismas condiciones produce efectos similares a los del LTB₄, si bien son necesarias dosis unas 1000 veces mayores (0.2 a 50 µg) [316,322,323]; esta diferencia de magnitud es similar a la que existe entre las concentraciones de ambos compuestos presentes en extractos de piel lesional psoriásica, lo que sugiere que la contribución biológica de ambos es similar [323]. Estos estudios se han efectuado habitualmente con la mezcla racémica de los estereoisómeros (S) y (R) del 12-HETE; estudios recientes [298,324] indican que el principal enantiómero presente en las escamas de psoriasis es el 12(R)-HETE, cuyo efecto quimiotáctico *in vivo* sobre los PMN tras la aplicación tópica sobre la epidermis humana es superior al del 12(S)-HETE, el principal metabolito por la vía de la 12-lipoxigenasa en las plaquetas [325].

No se ha observado en ningún caso la aparición de lesiones de psoriasis en respuesta a la aplicación repetida de LTB₄ o 12-HETE, apreciándose el desarrollo de tolerancia farmacológica frente a estas sustancias, con carácter cruzado y posiblemente secundaria a la producción local de un inhibidor del efecto farmacológico de ambas sustancias [316-320,323,326]. El mecanismo de tolerancia constituye una probable explicación para la falta de efecto de la aplicación tópica de estos eicosanoides sobre la epidermis no lesional de pacientes psoriásicos [319,323,327]. La aplicación simultánea de LTB₄ y 12-HETE no tiene por otra parte efecto sinérgico alguno [323].

1.8.2. EFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LOS POLINORFONUCLEARES HUMANOS.

El LTB_4 es un potente estímulo funcional para los PMN, induciendo su migración quimiotáctica, su agregación, un aumento de su adherencia a las superficies, de su actividad fagocitaria y de la liberación de enzimas lisosómicas, a concentraciones del orden de 10^{-9} a 10^{-11} M [328]. Estos efectos del LTB_4 sobre los PMN humanos se ejercen a través de su unión selectiva y específica con un receptor de membrana [328] cuyos niveles y afinidad no están alterados en los PMN de pacientes psoriásicos [329]. Los trastornos observados en el funcionalismo de los PMN circulantes en los pacientes psoriásicos no son secundarios a un aumento intrínseco en la actividad de la 5-lipoxigenasa en los PMN [283-285], sino que deben atribuirse a otro(s) mecanismo(s). Sin embargo, en las lesiones de psoriasis, la acumulación de PMN atraídos por eicosanoides quimiotácticos y otros mediadores (factores del complemento, citoquinas, péptidos quimiotácticos), con un posible efecto sinérgico, y activados por el LTB_4 aumentaría los niveles locales de LTB_4 , amplificando la respuesta al mismo. El 12-HETE tiene asimismo un efecto quimiotáctico sobre los PMN humanos [330], si bien menos potente que el del LTB_4 .

El 15-HETE inhibe de forma específica y selectiva la quimiotaxis de PMN humanos inducida por LTB_4 [331], lo que constituye otra evidencia del posible papel fisiológico de los metabolitos de la 15-lipoxigenasa como antagonistas de los efectos proinflamatorios del LTB_4 .

1.8.3. EFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LOS QUERATINOCITOS EPIDERMICOS HUMANOS.

La PGE_2 , cuya concentración está elevada en las lesiones psoriásicas, produce un incremento en la síntesis de ADN en los cultivos de queratinocitos [253]. El 12-HETE, los peptidoleucotrienos y especialmente el LTB_4 , son capaces de estimular la captación de 3H -timidina o la síntesis de ADN, tanto en cultivos de queratinocitos humanos [290,293,332,333] como in vivo en el cobaya [334] y el ser humano [335]. Sin embargo, recientemente se ha puesto en duda la capacidad del 12-HETE para inducir la proliferación celular, tanto en cultivos de queratinocitos humanos neonatales [336] como en líneas de carcinoma escamoso [189].

El mecanismo de producción de estos efectos de los eicosanoides sobre los queratinocitos parece estar en relación con la existencia de receptores específicos para eicosanoides tales como el LTB_4 [190,337], el LTC_4 [191] o el 12(S)-HETE [189], si bien para algunos autores, el LTB_4 podría tener un efecto directo sobre la movilización del Ca^{2+} en el queratinocito [191,338].

Puesto que la capacidad de proliferación en cultivo de los queratinocitos psoriásicos no difiere de la de los normales [68,339], la proliferación epidérmica existente en las lesiones de psoriasis podría deberse a una mayor respuesta por parte de los queratinocitos psoriásicos frente a los diversos factores (incluyendo los eicosanoides) que promueven la síntesis de ADN.

1.8.4. EFECTOS DE LOS EICOSANOIDES SOBRE LAS CELULAS INMUNOCOMPETENTES HUMANAS.

Los leucotrienos tienen un efecto modulador sobre la inmunidad celular, cuyas implicaciones clínicas no han sido totalmente aclaradas. El LTB_4 activa la guanilato-ciclasa en los linfocitos, estimula la actividad de las células natural killer humanas, y ejerce una actividad reguladora sobre un subconjunto de linfocitos T humanos, cuyo efecto neto es inmunosupresor [340,341]. Por otra parte, el LTB_4 es capaz de revertir el efecto inhibitorio de los corticosteroides sobre la proliferación de células T y la producción de interleucina 2 [342]. El LTB_4 y los peptidoleucotrienos son capaces de inducir la síntesis de τ -interferón en ausencia de linfocitos T helper o de interleucina 2 [343]. Posiblemente el mecanismo común a estos efectos sea la activación de la guanilato-ciclasa en el linfocito, a través de la unión del LTB_4 a un receptor específico.

Existen múltiples evidencias de una interesante interrelación entre los eicosanoides y la interleucina 1 (IL-1), que son capaces de actuar como mediadores autocrinos y paracrinos de los queratinocitos; los eicosanoides parecen ejercer un importante papel regulador en la biosíntesis de IL-1. El LTB_4 y el LTD_4 aumentan la síntesis de IL-1 en los monocitos humanos con independencia de que éstos estén estimulados o no [344]. La síntesis de IL-1 en este modelo celular se ve incrementada por la adición de indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa, y se potencia aún más por la adición de LTB_4 . De forma similar, en macrófagos estimulados mediante endotoxina se sintetizan tanto prostaglandinas como IL-1, y la adición de PGE_2 o PGI_2 exógenas determina una inhibición en la producción de IL-1 dependiente de la dosis, mientras que los inhibidores de la ciclooxigenasa incrementan la producción de IL-1 [345].

Sin embargo, no todos los autores han sido capaces de confirmar el efecto autorregulador de la liberación de IL-1 por la PGE₂ en macrófagos [346]. Por otra parte, en cultivos de queratinocitos humanos, la adición de IL-1 exógena, o la producción de IL-1 tras la irradiación con luz ultravioleta B induce un aumento en la síntesis de PGE₂ y PGE_{2α}, mientras que la PGE₂ aparentemente no regula la producción de IL-1, puesto que ésta no se modifica por la adición de indometacina ni se produce una inhibición homeostática por parte de la PGE₂ endógena o exógena [125].

1.9. IMPLICACIONES DE LA MODULACION DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR DIVERSOS FARMACOS EFICACES EN EL TRATAMIENTO DE LA PSORIASIS.

Diversos fármacos que se han demostrado eficaces en el tratamiento tópico de la psoriasis pueden deber su acción, al menos en parte, a la modulación que ejercen sobre el metabolismo del AA. La misma oclusión, cuyo efecto terapéutico sobre las placas de psoriasis es bien conocido desde hace tiempo, es capaz por sí sola de producir un descenso en los niveles de AA y 12-HETE en las placas de psoriasis [347].

En la evaluación de la eficacia terapéutica de cualquier preparado de aplicación tópica debe tenerse en cuenta el posible efecto terapéutico del excipiente, que se puede explicar en ocasiones en base a una posible modulación del metabolismo del AA. La aplicación tópica de vaselina sobre piel de cerdo lesionada produce una inhibición de la actividad de las lipoxigenasas presentes en preparados microsomales, mientras que cuando se emplea piel de ternera fetal se observa una disminución en la síntesis de PGE₂ y PGF_{2α} [348].

1.9.1. ALQUITRANES. DITRANOL.

La eficacia terapéutica de algunos alquitranes, como el ictiol, se podría deber a un efecto antiinflamatorio mediado por la supresión de la síntesis de LTB₄ por parte de los PMN, y de su respuesta quimiotáctica frente al mismo [349,350].

El ditranol podría deber en parte su efecto terapéutico en la psoriasis a la inhibición de la 12-lipoxigenasa epidérmica [351]

y de la 5-lipoxigenasa en los PMN humanos [352]. El efecto del ditranol sobre el metabolismo del AA podría ser aún más complejo, puesto que inhibe la ω -oxidación del LTB_4 por parte de los PMN [352] y produce una oxidación no enzimática del AA, lo que podría explicar en parte su efecto irritativo [353]. Sin embargo, otros autores no han observado modificación alguna en los niveles de 12-HETE o LTB_4 en el trasudado procedente de placas de psoriasis tratadas con ditranol tópico al 0.25% durante 10 días, pese a la mejoría clínica y la disminución en los niveles de AA, por lo que consideran poco probable que el efecto terapéutico del ditranol se deba a la inhibición de la formación de productos del AA por la vía de las lipoxigenasas [354]. Una posibilidad alternativa sería la producción de eicosanoides con efecto antiinflamatorio: un única aplicación de ditranol al 3% sobre piel de pacientes psoriásicos induce un aumento de los niveles de PGE_2 en el fluido contenido en ampollas de succión [355], y la aplicación tópica de PGE_2 produce mejoría en lesiones de psoriasis [356].

Finalmente, el mecanismo más probable del efecto terapéutico del ditranol sería la inhibición de la migración de los PMN, como indican diversos estudios tanto *in vitro* [357,358] como, en respuesta al LTB_4 , *in vivo* [359]. La inhibición de la quimiotaxis de PMN en respuesta al estímulo del LTB_4 sería un mecanismo de acción común a diversos fármacos eficaces en el tratamiento de la psoriasis, tales como los corticosteroides tópicos [360], el metotrexate [361,362] y el etretinato [363].

1.9.2. CORTICOIDES.

La acción antiinflamatoria de los corticoides se debe en parte a que su efecto promotor de la síntesis de lipocortina, que inhibe la actividad de la fosfolipasa A_2 . La aplicación de diacetato de diflorasona bajo oclusión induce una disminución en los niveles de AA y 12-HETE presentes en homogenados de biopsias procedentes de

placas de psoriasis [347]. El propionato de clobetasol ejerce además una acción inhibitoria sobre la síntesis de LTB_4 , aunque no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la síntesis de 12-HETE ni de PGE_2 , en fluido recogido en cámaras situadas sobre placas de psoriasis sometidas a raspado con bisturí [364,365]. Las diferencias existentes entre los anteriores estudios pueden atribuirse a diferencias de actividad de los corticoides empleados, pero es mucho más probable que se deban a diferencias metodológicas en la pauta de tratamiento, de obtención de muestras y análisis de las mismas, lo que debe tenerse en cuenta al interpretar los diferentes estudios.

Existen evidencias de otros posibles mecanismos de acción de los corticosteroides en relación con los eicosanoides. Por una parte, en relación con el mecanismo inmunosupresor de los corticosteroides, se han comunicado resultados que indican que la inhibición de la producción de IL-2 y proliferación de los linfocitos se debe a una inhibición de la producción de LTB_4 endógeno [342]. Por otra parte, la aplicación tópica de propionato de clobetasol inhibe la respuesta quimiotáctica de los PMN frente al LTB_4 en la epidermis humana [360].

1.9.3. METOTREXATE.

La acción terapéutica del metotrexate en la psoriasis se debe en parte a su efecto antiproliferativo, pero también se ha observado una acción inhibidora de este fármaco sobre la quimiotaxis de los PMN y los monocitos [366]. La administración de metotrexate inhibe asimismo la acumulación de PMN en las lesiones inducidas en piel no afecta de psoriásicas por la aplicación tópica de LTB_4 [361, 362].

1.9.4. RETINOIDES.

La acción terapéutica del etretinato en la psoriasis podría deberse en parte a una disminución en los niveles de AA, 12-HETE [367,368] y PGE₂ [367], como se ha observado en el trasudado procedente de placas de psoriasis de pacientes tratados durante 35 días a la dosis de 50 mg diarios. Estas observaciones están en consonancia con el efecto modulador del metabolismo del AA por parte de diversos retinoides en varios tipos celulares [369-371].

Al igual que ocurre en el caso del metotrexate, el efecto del etretinato podría tener lugar sobre la respuesta quimiotáctica de los PMN: se ha descrito la inhibición por parte del etretinato del efecto quimiotáctico del suero de pacientes psoriásicos [372], así como de la aplicación epicutánea de LTB₄ [363] sobre los PMN en la epidermis humana.

1.9.5. CICLOSPORINA.

La eficacia de la ciclosporina en el tratamiento de la psoriasis se ha correlacionado con una disminución del 64% en los niveles lesionales de LTB₄ en los pacientes con respuesta positiva al tratamiento [373]. Esta reducción, si bien podría ser secundaria a la normalización del metabolismo del AA en la epidermis psoriásica como consecuencia de la acción terapéutica de la ciclosporina, también podría ser un efecto directo de este fármaco, resultante de su actividad inhibitoria sobre la fosfolipasa A₂, detectada en diversos modelos celulares [374,375].

El posible efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA en suspensiones de células epidérmicas y fibroblastos dérmicos humanas *in vitro*, constituye uno de los objetivos de estudio de la presente tesis, que se desarrolla en los correspondientes aparta-

dos.

1.9.6. FOTOTERAPIA Y FOTOQUIMIOTERAPIA.

El aumento de los niveles de AA, PGE₂ y PGF_{2α} en el fluido contenido en ampollas de succión obtenidas tras la exposición de piel humana sana a la radiación UVB y UVC es bien conocido [376,377]. Las implicaciones fisiopatológicas de las prostaglandinas en estas reacciones fotobiológicas se confirman por el efecto de la aplicación tópica de indometacina [378] en el eritema inducido por ambos tipos de radiación ultravioleta, así como en las quemaduras solares.

Por el contrario, tanto los efectos biológicos de los UVA como la eficacia de la fotoquimioterapia (PUVA) no se deben a una modulación de la vía de la ciclooxigenasa [379], por lo que algunos de sus efectos se podrían derivar de una hipotética acción sobre el metabolismo del AA por la vía de las lipoxigenasas.

Recientemente se ha propuesto la inhibición del efecto quimiotáctico del LTB₄ sobre los PMN como mecanismo alternativo para explicar el efecto de la fotoquimioterapia (PUVA) y la fototerapia con UVB [380], así como de otros agentes terapéuticos [361-363] en la psoriasis. En relación con el papel de los eicosanoides por lo que respecta a la fototerapia de la psoriasis, también se ha propuesto recientemente la hipótesis de que el efecto de los UVB pudiera venir dado en parte por la fotodegradación del LTB₄ [381,382].

1.9.7. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES.

La inhibición de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa por parte de los antiinflamatorios no esteroideos tiene también importantes

implicaciones terapéuticas potenciales en la psoriasis. La indometacina inhibe preferentemente la ciclooxigenasa, por lo que el metabolismo del AA deriva hacia la producción de leucotrienos. Este mecanismo podría justificar el empeoramiento de la psoriasis que se ha observado en algunos pacientes tras la administración de indometacina por vía oral [383] y tópica [384], aunque en este último caso tal vez sería más propiamente decir que la indometacina impide el efecto terapéutico del propio vehículo [385], si bien otros autores no han observado dicho efecto [386]. Las discrepancias existentes en cuanto al efecto de la indometacina no son de extrañar si se tiene en cuenta la multiplicidad de las acciones de este fármaco, entre las que se incluye la inhibición de la fosfolipasa A₂, de la lipoxigenasa y de la actividad funcional de los neutrófilos [387].

Otros antiinflamatorios no esteroideos tienen efectos diversos sobre otras vías metabólicas del AA que dan lugar a eicosanoides autorreguladores. Un ejemplo de ello es el ibuprofén, que estimula la síntesis por parte de los PMN de derivados de la 15-lipoxigenasa, de los que el 15-HETE tiene un papel de especial trascendencia, por su acción inhibitoria de la 5-lipoxigenasa y, en consecuencia, de la formación de LTB₄ [388].

1.9.8. INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA.

El benoxaprofén se consideró que tenía un efecto inhibitorio preferente sobre la 5-lipoxigenasa en los PMN [389], lo que podría explicar en parte su efecto terapéutico en la psoriasis [390,391]; sin embargo, en la actualidad no se considera que el benoxaprofén tenga una actividad significativa sobre la 5-lipoxigenasa de los PMN, ni *in vivo* ni *in vitro*, sino que actúa como inhibidor de la ciclooxigenasa y la migración de los neutrófilos [392-394]. La toxicidad del benoxaprofén obligó a la retirada de este fármaco,

pero las posibles implicaciones terapéuticas del desarrollo de inhibidores de la 5-lipoxigenasa han determinado un enorme interés de muchas compañías farmacéuticas por este grupo farmacológico [395].

Recientemente se han efectuado estudios en modelos de inflamación cutánea experimental y se ha propuesto la utilización en el tratamiento tópico de la psoriasis de diversos inhibidores de la 5-lipoxigenasa, tales como el lonapalene (RS 43179) [396,397], el L-651,896 [398-400], el tepoxalin (ORF 20485) [401], el R 68 151 [402], el 2-benzil-1-naftol [403] y el ácido nordihidroguayarático [404,405], si bien en el caso de este último fármaco no se ha demostrado la eficacia de dicho enfoque terapéutico a nivel clínico ni bioquímico [404,405].

De los fármacos sometidos a ensayo clínico, el que presenta un mayor interés práctico es el lonapalene, cuya aplicación tópica ha demostrado una eficacia comparable a la de los corticoides tópicos en el tratamiento de las placas de psoriasis [406-409].

El ácido 5-aminosalicílico es otro inhibidor de la 5-lipoxigenasa [410,411] cuya aplicación tópica al 5% tres veces al día sobre placas de psoriasis produce una respuesta significativamente mejor que el placebo [412]. Este fármaco presenta un especial interés, puesto que su eficacia terapéutica en su indicación estándar, la colitis ulcerosa, también depende al parecer de su efecto sobre el metabolismo del AA en la mucosa rectal [413], y los metabolitos del AA por la vía de la 5-lipoxigenasa intervienen al parecer en la fisiopatología de la colitis ulcerosa [414]. Por otra parte, el ácido 5-aminosalicílico constituye al parecer la porción activa de la molécula de sulfasalazina, cuyo efecto terapéutico sobre la psoriasis vulgar, a la dosis de 3 g/día por vía oral, se ha demostrado recientemente [415,416].

Finalmente, los imidazoles también son candidatos a una potencial aplicación terapéutica en la psoriasis, tanto por el efecto inhibidor de la 5-lipoxigenasa [417], que podría explicar el efecto antiinflamatorio de algunos de ellos [418], como por su acción sobre los enzimas dependientes del citocromo P-450 [419], y en concreto sobre la monooxigenasa que parece estar implicada en la síntesis de 12-HETE por los queratinocitos humanos [276].

Por su especial relevancia con respecto a la relación fisiopatológica de los eicosanoides con la psoriasis y sus implicaciones terapéuticas, que constituyen el objeto de esta tesis, se ha efectuado un estudio farmacológico del efecto de diversos fármacos inhibidores de la 5-lipoxigenasa sobre el metabolismo del AA en diversos modelos celulares, como se detalla más adelante en los correspondientes apartados.

Los inhibidores de la 12-lipoxigenasa no han sido objeto de mucha atención pero podrían ser por lo menos tan valiosos como los inhibidores de la 5-lipoxigenasa. Una posibilidad terapéutica no explorada suficientemente en relación con la psoriasis, aunque objeto en la actualidad de una investigación exhaustiva orientada al desarrollo de agentes antialérgicos o antiasmáticos, sería el desarrollo de inhibidores del metabolismo del LTA₄ o antagonistas específicos de los leucotrienos [420].

1.10. IMPLICACIONES DE LA MODULACION DIETETICA DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARQUIDONICO EN LA PSORIASIS MEDIANTE ACEITE DE PESCADO RICO EN ACIDO EICOSAPENTAENOICO.

Recientemente hemos asistido al desarrollo de un gran interés por el efecto del aceite de pescado sobre la psoriasis, que se inició en los años 60 y 70 a raíz de diversos estudios epidemiológicos que demostraron que la incidencia de psoriasis en los esquimales

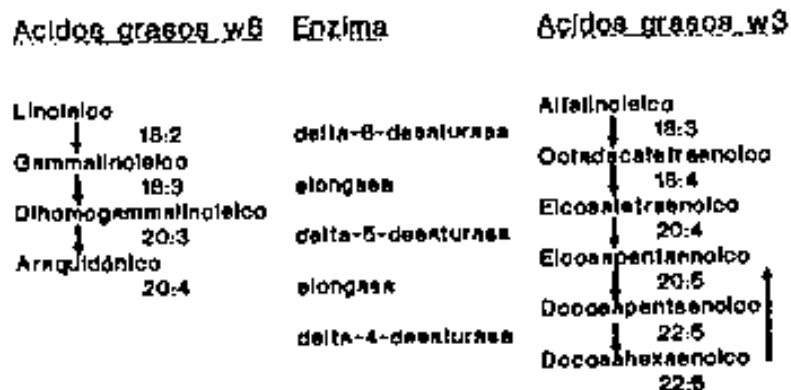
era una veintecava parte de la de los daneses [421].

Las dietas de los daneses y los esquimales son semejantes en el contenido de grasas, pero los daneses ingieren una elevada cantidad de ácidos grasos ω -6, que se encuentran en las grasas animales, la mantquilla y los aceites vegetales, mientras que los esquimales ingieren un elevado porcentaje de ácidos grasos ω -3, que se encuentran principalmente en los aceites de pescado [422].

Entre los ácidos grasos ω -6 se incluyen el ácido araquidónico (AA) (20:4 ω 6) y el ácido linoleico (18:2 ω 6), caracterizados por tener su primer doble enlace a 6 carbonos de distancia del extremo metilo de la cadena del ácido graso. Entre los ácidos grasos ω -3, cuyo primer doble enlace se encuentra a 3 carbonos de distancia del extremo metilo de la cadena del ácido graso, se incluyen el ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5 ω 3) y el ácido linolénico (18:3 ω 3) (Fig. 1.10.1).

El aceite de pescado contiene grandes cantidades de EPA, un ácido graso 20:5 ω 3 relacionado con el AA (20:4 ω 6), mientras que en la carne y los productos lácteos el contenido de EPA es mínimo. El aceite de pescado también contiene canti-

Metabolismo ácidos grasos dieta



250 g de caballa o salmón = 3 g EPA + DHA

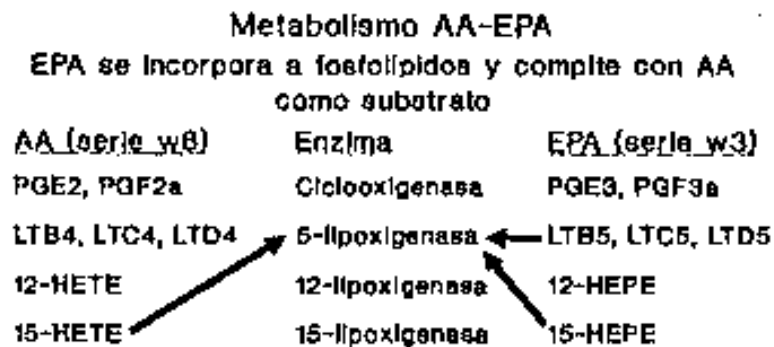
Fig. 1.10.1

dades significativas de ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6 ω 3). Este ácido graso poliinsaturado resulta de la elongación y desaturación del ácido linoleico (18:3 ω 3) presente en la dieta. El DHA presente en el aceite de pescado es un inhibidor competitivo de la ciclooxigenasa [423], y puede ser metabolizado por la vía de las lipoxigenasas [424], por lo que podría dar lugar a la producción de LTB₄ y 12-HETE, con un efecto contraproducente desde el punto de vista terapéutico en la psoriasis. Sin embargo, la incorporación del EPA a la membrana celular tiene un efecto terapéutico en la psoriasis, como se discute más adelante, y se ha demostrado la posibilidad de que el DHA pueda convertirse en EPA *in vivo* [425,426], por lo que el efecto neto del DHA todavía no está completamente aclarado.

La biosíntesis del AA en los tejidos de los mamíferos procede principalmente de los ácidos grasos esenciales presentes en la dieta (ácido linoleico y γ -linolénico) [427,428]. El AA que se forma se incorpora predominantemente en los fosfolípidos de membrana. Cuando el AA se libera debido a múltiples factores, puede ser oxidado por diferentes vías, dando lugar a los diversos eicosanoides.

La manipulación de la dieta podría modificar la formación y el metabolismo del AA a través de dos posibles mecanismos: en primer lugar, la liberación de otros ácidos grasos poliinsaturados (diferentes del AA) incorporados a los fosfolípidos de la membrana celular podría dar lugar a la formación de metabolitos con menor actividad biológica que los del AA; en segundo lugar, la liberación de otros ácidos grasos poliinsaturados podría determinar una competencia directa con el AA como sustrato de las enzimas que catalizan las vías de la ciclooxigenasa y las lipoxigenasas. Estos efectos se han observado en diversos modelos celulares, con implicaciones en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, tales como la aterosclerosis, la cardiopatía coronaria, la

hipertensión, las dislipemias, el lúpus eritematoso, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la psoriasis [429].



Cuando se administra una dieta con elevado contenido en aceite de pescado, el EPA se incorpora

————— = inhibición
 LTB5 antagonista LTB4 (proinflamatorio)

DHA se convierte en EPA, pero inhibe ciclooxigenasa

Fig. 1.10.2

en las membranas celulares [430,431] y compete con el AA como sustrato de la ciclooxigenasa [432] y la lipoxigenasa [433], disminuyendo la síntesis de eicosanoides y produciendo diversos metabolitos (Fig. 1.10.2) que son en su mayor parte menos activos biológicamente que los derivados del AA [434-438]. También existen evidencias recientes de que el EPA puede actuar inhibiendo la síntesis de diversas citoquinas implicadas en la fisiopatogenia de la psoriasis, tales como la IL-1, por parte de los monocitos [439], y tal vez los propios queratinocitos.

A partir de las primeras comunicaciones [440,441], la posible eficacia del EPA en el tratamiento de la psoriasis ha sido objeto de diversos estudios [442-450].

La diversidad de los resultados y las diferencias metodológicas en los diferentes estudios publicados han motivado la realización de un estudio de la eficacia clínica del tratamiento con aceite de pescado rico en EPA en pacientes con psoriasis vulgar en placas

crónica estable, que constituye uno de los objetivos de la presente tesis, como se discute más adelante en los correspondientes apartados.

|

2. HIPOTESIS DE TRABAJO
Y ESTUDIOS PRELIMINARES.

2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO

- 1) No existe una alteración cualitativa intrínseca del metabolismo del AA en los tipos celulares que pueden intervenir en la fisiopatología de la psoriasis, por lo que pueden emplearse células normales como modelo en estudios farmacológicos. El estudio del efecto de diversos grupos farmacológicos de potencial interés terapéutico en la psoriasis sobre el metabolismo del AA en diversos tipos celulares puede aportar información útil para comprender mejor el mecanismo de acción de dichos fármacos y las posibles limitaciones en su empleo terapéutico.

- 2) Diversos fármacos inhibidores de la actividad de la 5-lípoxigenasa pueden tener utilidad terapéutica en la psoriasis si se demuestra su efecto sobre el metabolismo del AA en los tipos celulares implicados en la fisiopatología de la enfermedad.

- 3) Diversos imidazoles, además del ketoconazol, pueden tener actividad inhibitoria sobre la 5-lipoxigenasa u otros enzimas que intervienen en la síntesis de eicosanoides. Ello podría explicar en parte su eficacia terapéutica y su posible efecto antiinflamatorio en diversas micosis y en la dermatitis seborreica, que presenta características clínicas, histológicas y de cinética celular semejantes a las de la psoriasis. Por consiguiente, el estudio farmacológico del efecto de diversos imidazoles sobre el metabolismo del AA en los tipos celulares que intervienen en la fisiopatología de la psoriasis puede conducir al desarrollo de fármacos con potencial terapéutico en esta enfermedad.

- 4) La eficacia terapéutica de la ciclosporina en la psoriasis depende principalmente de su efecto inmunomodulador, pero también posiblemente en parte de un efecto antiproliferativo directo sobre los queratinocitos, entre otros tipos celulares. El estudio del posible efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA puede contribuir a un mejor conocimiento del mecanismo de esta acción antiproliferativa.

- 5) El tratamiento dietético con ácidos grasos ω -3 tales como el EPA puede tener un efecto terapéutico en la psoriasis. La posible correlación de la mejoría clínica con los parámetros histológicos y bioquímicos puede contribuir a establecer el papel del EPA como tratamiento único o coadyuvante de la psoriasis.

2.2 ESTUDIOS PRELIMINARES.

Se realizó un estudio preliminar del perfil metabólico del AA en diversos tipos celulares a fin de: a) valorar su posible contribución a los niveles elevados de eicosanoides que se encuentran en las lesiones de psoriasis crónica en placas, b) establecer las posibles diferencias cualitativas con los respectivos tipos celulares procedentes de individuos sanos y c) evaluar su empleo como modelo para el estudio *in vitro* de la acción sobre el metabolismo del AA por parte de diversos fármacos con posible utilidad terapéutica en la psoriasis.

2.2.1. ESTUDIO PRELIMINAR DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS, PLAQUETAS Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES PROCEDENTES DE VOLUNTARIOS SANOS.

La figura 2.2.1.1 muestra los cromatogramas típicos de las células epidérmicas humanas incubadas con 10 μ M AA + 5 μ M de ionóforo A23187, obtenidos con las dos técnicas cromatográficas descritas en el apartado de Material y Métodos (4.2). La técnica T1 permite una perfecta resolución de los leucotrienos: LTB₄, 6-trans-LTB₄, 6-trans-12-epi-LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄, aunque en la figura 2.2.1.1a sólo se muestra el LTB₄, así como la separación del 15-HETE, 12-HETE y 5-HETE. En la figura 2.2.1.1a se observa la presencia de 3 picos en los cromatogramas obtenidos mediante la técnica T1 en las muestras de células epidérmicas: el pico Ia eluyó con el frente de solvente y corresponde a compuestos de mayor polaridad que las prostaglandinas, que eluyeron sin resolución en el pico IIa; el tercer pico coeluyó con el patrón de 12-HETE. No se observaron en ningún caso (n=10) picos en la zona de retención de los leucotrienos ni tampoco ningún pico que correspondiera a los tiempos de

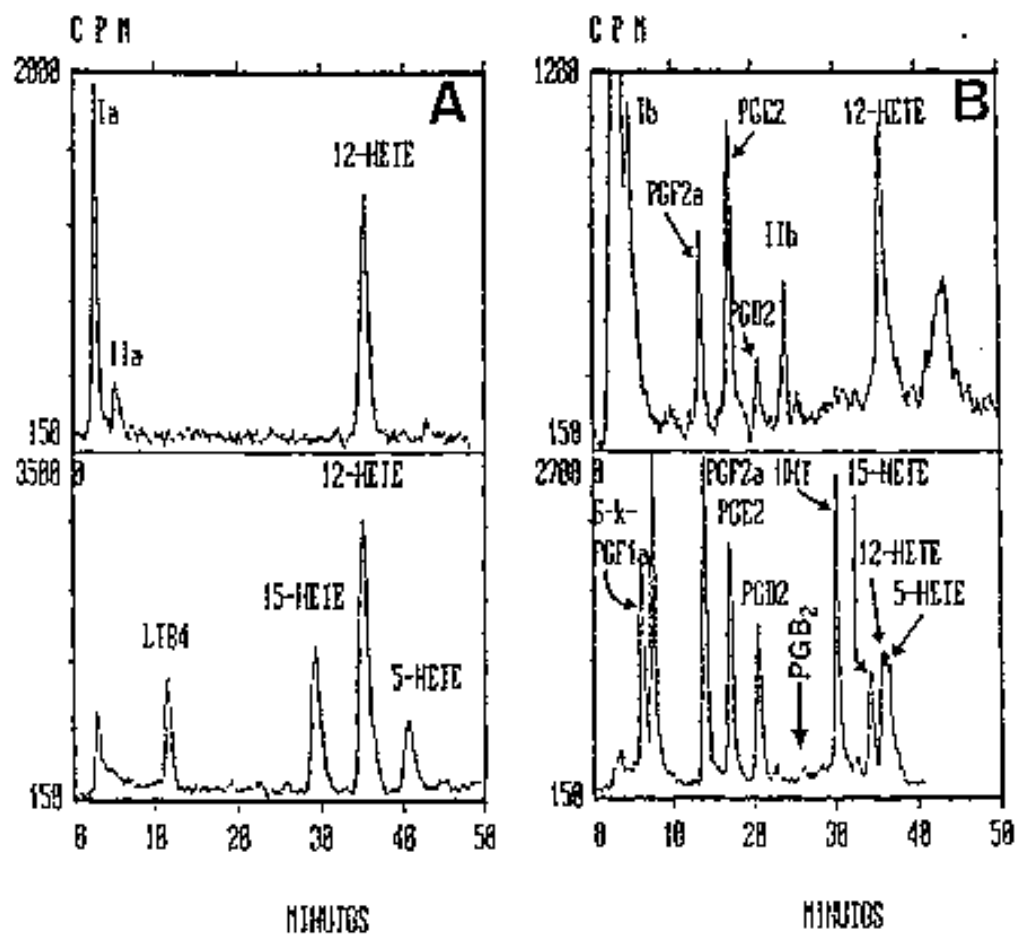


Fig. 2.2.1.1. Cromatogramas típicos de las muestras de céls. epidérmicas, empleando T1 (a) y T2 (b). Muestras arriba, patrones marcados abajo.

retención de los HETEs que no fuera el 12-HETE.

La figura 2.2.1.1b muestra el perfil obtenido con la técnica T2, que permite la completa separación de los prostanoïdes, observándose un pico (Ib) que eluyó con el frente de solvente y correspon-

de a compuestos de mayor polaridad que las prostaglandinas; los picos que coeluyeron con la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la PGE_2 y la PGD_2 respectivamente; un pico no identificado de menor polaridad (Iib), y un pico que coeluyó con los patrones del 12-HETE y el 5-HETE, cuya separación no permite esta técnica, y que corresponde al pico del 12-HETE empleando la técnica T1. En algunas muestras se observó la aparición de un pequeño pico con tiempo de retención correspondiente al HHT.

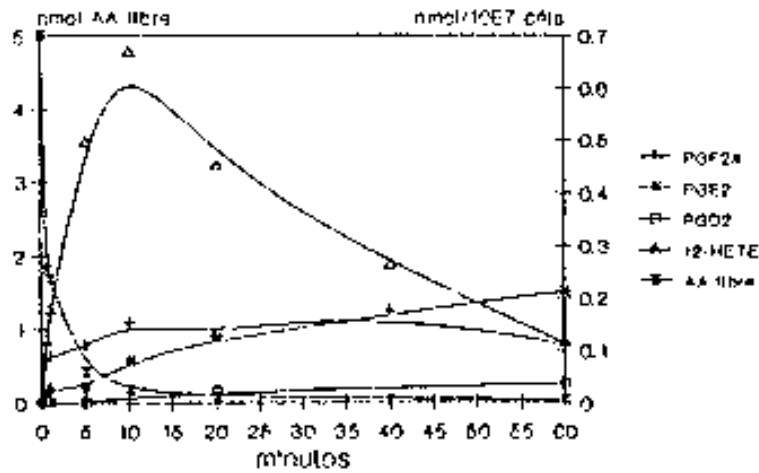
Los perfiles obtenidos tras efectuar las incubaciones con AA solo y con la adición simultánea de 5 μM de ionóforo A23187 o de 10 μM de PAF fueron idénticos, no pudiéndose observar en ningún caso la aparición de picos correspondientes a productos derivados de la actividad de la 5-lipoxigenasa.

Las muestras incubadas con 50 μM de indometacina mostraron un único pico que coeluyó con el patrón de 12-HETE, y que aumentó en un $49,94 \pm 8.6\%$ ($n=5$) con respecto a las muestras incubadas en ausencia de indometacina.

Cinética de tiempo de formación de los eicosanoides. La figura 2.2.1.2 muestra la cantidad de cada producto en función del tiempo de incubación ($n = 4$). Se observó un máximo de producción de los compuestos derivados de la actividad de la ciclooxigenasa y 12-lipoxigenasa a los 10 minutos de incubación, excepto en el caso del pico Iib, que alcanzó el máximo a los 40 minutos, observándose posteriormente una paulatina disminución de todos los compuestos.

El pico Iib, a partir de la observación de los datos cinéticos, parecía un producto derivado de la PGE_2 (Fig. 2.2.1.3), lo que concordaba con la inhibición de su producción por la indometacina, y se confirmó posteriormente incubando suspensiones de células epidérmicas con patrón tritinado de PGE_2 durante 15 minutos a 37°C , que dio lugar a la aparición del pico Iib.

TIME COURSE DE LA PRODUCCIÓN DE EICOSANOIDES POR CELULAS EPIDERMICAS



10 μM AA

Fig. 2.2.1.2.

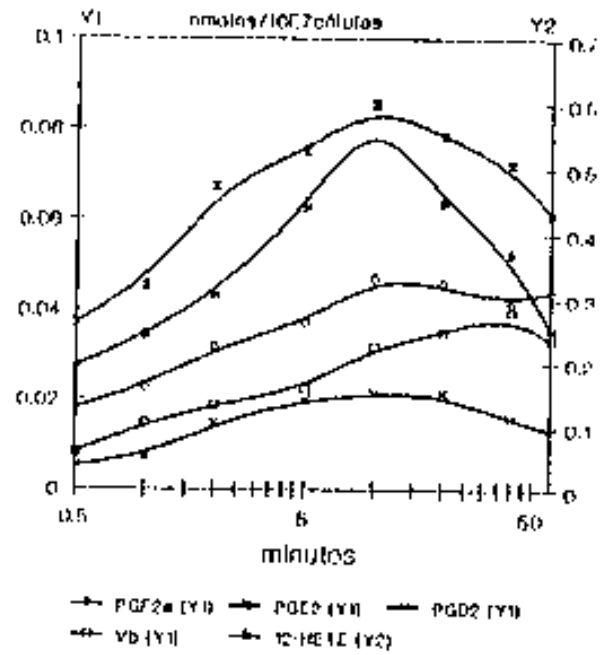
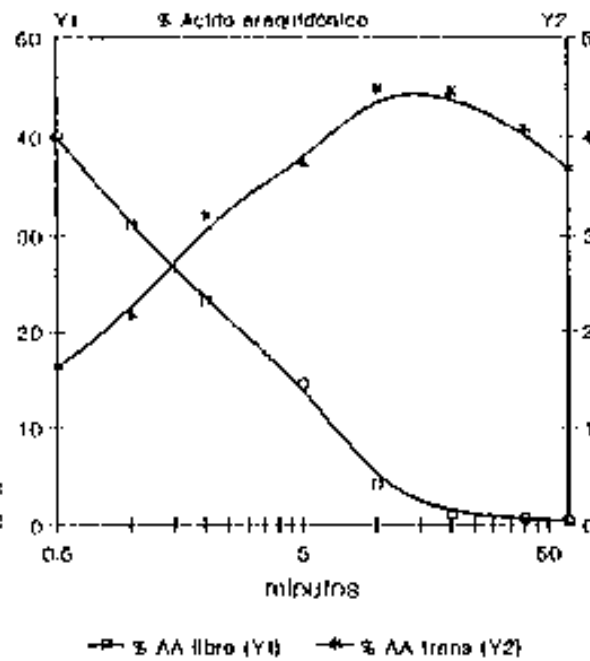


Fig. 2.2.1.3. Time course de síntesis de productos minoritarios del AA exógeno por células epidérmicas humanas.

Fig. 2.2.1.1. Transformación del ¹⁴C-AA por células epidérmicas humanas en función del tiempo de incubación.



En la figura 2.2.1.4 se muestra el porcentaje de AA libre y transformado en $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , PGD_2 , pico 11b y 12-HETE al cabo de diferentes tiempos de incubación, indicando la transformación del AA exógeno en el conjunto de picos cromatográficos correspondientes a los productos de las principales vías metabólicas del AA activas en las suspensiones de células epidérmicas (12-HETE y ciclooxigenasa).

Tal como se puede observar, la transformación del AA exógeno en productos de la ciclooxigenasa y la 12-lipoxigenasa alcanza un máximo entre los 10 y 20 minutos, disminuyendo posteriormente los niveles por metabolización o incorporación a la membrana.

Cinética de Tiempo de formación de LTB_4 , 5-HETE y productos de α -oxidación del LTB_4 por los PMN. En la figura 2.2.1.5 se muestra la

cinética de tiempo (time course) de formación de LTB_4 , 5-HETE y productos de α -oxidación del LTB_4 por los PMN, correspondiente al estudio de 5 muestras incubadas en presencia de ^{14}C -AA $10 \mu\text{M}$ y A23187 $5 \mu\text{M}$. La producción se expresa en nanomoles de ^{14}C -AA transformados en producto por 10^7 células.

El máximo de producción de LTB_4 y 5-HETE se alcanzó a los 5 minutos, disminuyendo posteriormente la producción de estos compuestos. La α -oxidación del LTB_4 aumentó progresivamente con el tiempo.

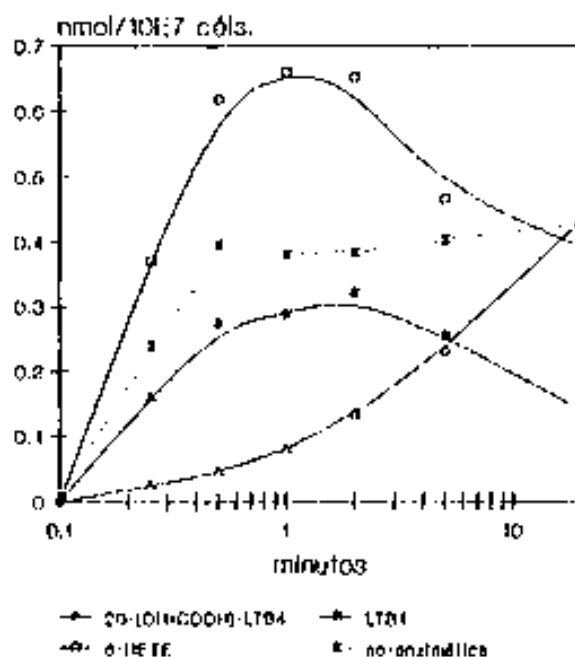


Fig. 2.2.1.5. Time course producción vía 5-lipo en PNN; $[^{14}\text{C}]$ -AA $10 \mu\text{M}$, A23187 $5 \mu\text{M}$; $n=5$.

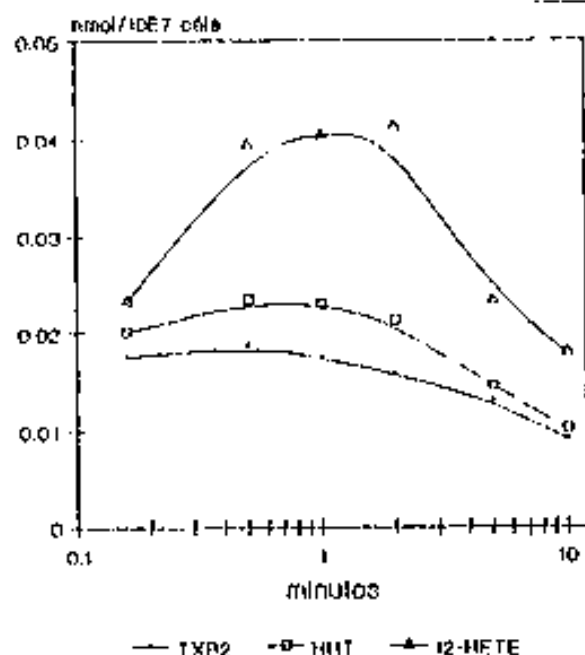
po de incubación.

Cinética de tiempo de formación de eicosanoides por suspensiones de plaquetas lavadas. En la figura 2.2.1.6 se muestra la cinética de tiempo (time course) de producción de TXB₂, HHT y 12-HETE, que constituyen los productos mayoritarios del metabolismo del AA en las plaquetas. Los datos corresponden al estudio de 3 muestras incubadas en presencia de ¹⁴C-AA 15 μM y A23187 5 μM. La producción se expresa en nanomoles de ¹⁴C-AA transformados en producto por 10⁷ células.

La biosíntesis de los productos de la ciclooxigenasa fue máxima a los 30 segundos, disminuyendo posteriormente. La producción de 12-HETE alcanzó su máximo a los 1-2 minutos de incubación.

La figura 2.2.1.7 muestra la cantidad de AA transformado en productos de la ciclooxigenasa y de la 12-lipoxigenasa por el mismo número de células epidérmicas y plaquetas.

En las condiciones de incubación empleadas, las células epidérmicas producen más eicosanoides que las plaquetas a través de ambas vías metabólicas: los cocientes de producción máxima fueron de 14.5 en el caso del 12-HETE y 4.5 en el caso de los productos de la ciclooxigenasa.



15 μM AA

Fig. 2.2.1.6. Time course de producción metabolitos AA en suspensiones de plaquetas humanas.

Los resultados obtenidos respecto al patrón metabólico de las células epidérmicas humanas en suspensión indican que los productos identificados por coelución con patrones auténticos procedentes de la actividad de la ciclooxigenasa son PGE_2 como producto mayoritario, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y en menor cantidad PGD_2 . El pico I1b, a partir de la observación de los datos cinéticos, parecía un producto derivado de la PGE_2 , lo que concordaba con

su inhibición por incubación con indometacina. Posteriormente se confirmó esta hipótesis mediante la incubación de patrón triliado de PGE_2 en suspensión de células epidérmicas y en medio RPMI, durante 15 min a 37°C , observándose la aparición del pico I1b.

El único producto derivado de la actividad de las lipoxigenasas identificado por coelución con patrones auténticos fue el 12-HETE, cuya producción fue del orden de 10 veces superior a la de los productos de la ciclooxigenasa. En ningún caso se detectaron productos de la 5-lipoxigenasa en las incubaciones con AA de 10 minutos de duración, ni tampoco en las incubaciones con AA más ionóforo A23187 o PAF-acéter (n=10). Las incubaciones en presencia de indometacina desviaron el metabolismo del AA únicamente hacia una mayor formación de 12-HETE, sin que se pudieran detectar productos de la 5-lipoxigenasa, ni siquiera en las incubaciones efectuadas con $5\mu\text{M}$ de A23187. Se realizaron 2 incubaciones durante 20 minutos con $10\mu\text{M}$ AA + $10\mu\text{M}$ A23187, sin que tampoco en estas

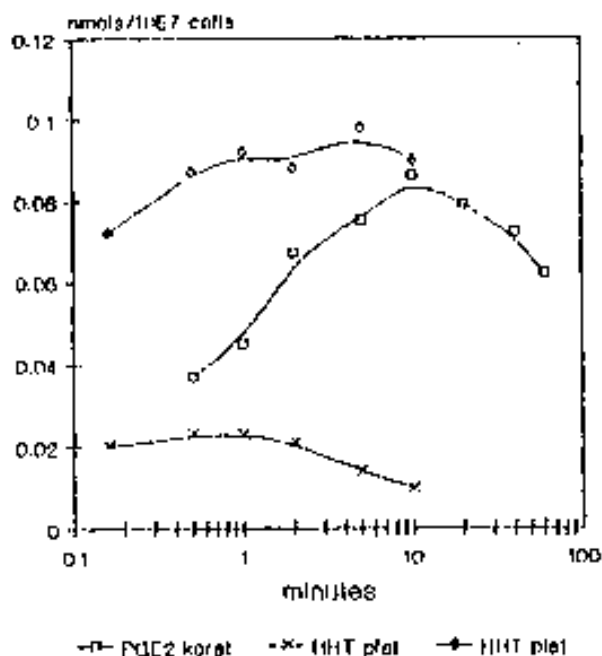


Fig. 2.2.1.7. Time course comparative queratinocitos (kerat) y plaquetas (plat).

condiciones se pudieran observar productos de la actividad de la 5-lipoxigenasa (resultados no presentados). Tampoco se hallaron productos de la ω -oxidación del LTB_4 . Estos resultados indican que en las suspensiones de células epidérmicas la actividad 5-lipoxigenasa, en caso de existir, es muy inferior a la de la 12-lipoxigenasa o la ciclooxigenasa. En 3 de las muestras estudiadas apareció un pequeño pico, cuyo tiempo de retención correspondió al del patrón de 15-HETE, y cuya magnitud fue del orden de 30 veces inferior a la del 12-HETE, lo que impidió su valoración exacta.

En resumen, nuestros resultados muestran que el producto mayoritario del metabolismo del AA en células epidérmicas humanas en suspensión es el 12-HETE, seguido de la PGE_2 y la $\text{PGF}_{2\alpha}$, no encontrándose metabolitos procedentes de la actividad de la 5-lipoxigenasa. A diferencia de los hallazgos de otros autores [266-269,271], no se identificaron productos de la 5-lipoxigenasa.

Estas observaciones tienen implicaciones en la psoriasis: los niveles de 12-HETE en la epidermis lesional son 15.5 veces mayores que en la epidermis normal [151]. Los datos que se ilustran en las figuras 2.2.1.2 a 2.2.1.4 indican que la disponibilidad del sustrato es el factor determinante de la máxima producción de eicosanoides. La producción máxima se alcanza a los 10 min (Fig. 2.2.1.3), mientras que el porcentaje del AA inicial disponible en dicho momento es de sólo un 4%. Sólo se transforma en los eicosanoides mayoritarios un 16% del AA presente inicialmente; el resto probablemente se esterifica en los fosfolípidos de membrana. El 12-HETE es el principal metabolito del AA producido por las células epidérmicas, y el factor limitante de su producción es la concentración de AA libre (es decir, el sustrato disponible), como indica la figura 2.2.1.4. Esta observación se correlaciona bien con la presencia de un aumento en los niveles de AA (26 veces) y 12-HETE (más de 82 veces) en la epidermis lesional con respecto a la no afectada en los pacientes con psoriasis [141]. Por consiguiente,

el aumento en la liberación de AA y su metabolismo por parte de las células epidérmicas probablemente determine el aumento observado en los niveles de 12-HETE presentes en la epidermis psoriásica. Se ha especulado sobre la contribución de las plaquetas a los niveles de 12-HETE presentes en las placas psoriásicas [290]; a nuestro juicio esta especulación carece de fundamento cuantitativo, dado que la producción celular de 12-HETE es unas 14.5 veces superior en las células epidérmicas que en las plaquetas, como ilustra la figura 2.2.1.7. Por otra parte, no existen datos que demuestren la presencia de plaquetas, en cantidades significativas, en la epidermis normal o lesional.

De acuerdo con nuestros resultados, la contribución de las células epidérmicas a los niveles de LTB_4 hallados en las placas de psoriasis probablemente es nula o no relevante en comparación con la de los PMN; no se observa actividad alguna de la 5-lipoxigenasa en las suspensiones de células epidérmicas, ni siquiera inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa con indometacina, lo que determina tan sólo un aumento en la producción de 12-HETE.

Por consiguiente, los productos de la 5-lipoxigenasa presentes en las placas de psoriasis proceden sin duda del aporte de los PMN presentes en la muestra por contaminación sanguínea o en la epidermis por exocitosis.

Las potenciales implicaciones biológicas de las diferencias observadas en la cinética de tiempo de producción del metabolismo del AA en las células epidérmicas y los PMN, y su correlación con los niveles de AA presentes en la epidermis requieren una ulterior evaluación. Se necesitan otros estudios para aclarar el papel fisiopatogénico de los metabolitos del AA producidos por los diferentes tipos celulares implicados en la psoriasis, en especial el 12-HETE y la PGE_2 , que constituyen los productos mayoritarios del metabolismo del AA en las células epidérmicas humanas.

2.2.2. ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LAS SUSPENSIONES DE PLAQUETAS PROCEDENTES DE PACIENTES PSORIASICOS Y VOLUNTARIOS SANOS.

Se estudiaron un total de 8 pacientes (6 hombres y 2 mujeres), con edades comprendidas entre 21 y 64 años, afectados de psoriasis en placas crónica estable, con un grado de afectación superior al 10% de la superficie corporal, que no habían recibido ningún tipo de tratamiento durante las dos semanas previas a la extracción. Ninguno de los pacientes era diabético, fumador ni había tomado antiinflamatorios no esteroideos durante las dos semanas previas a la extracción. Se utilizaron un total de 10 voluntarios sanos, no fumadores, con una distribución por sexos y rango de edades similares a los de los pacientes, como controles. Ninguno de los individuos estudiados había recibido medicación alguna durante las dos semanas anteriores al estudio.

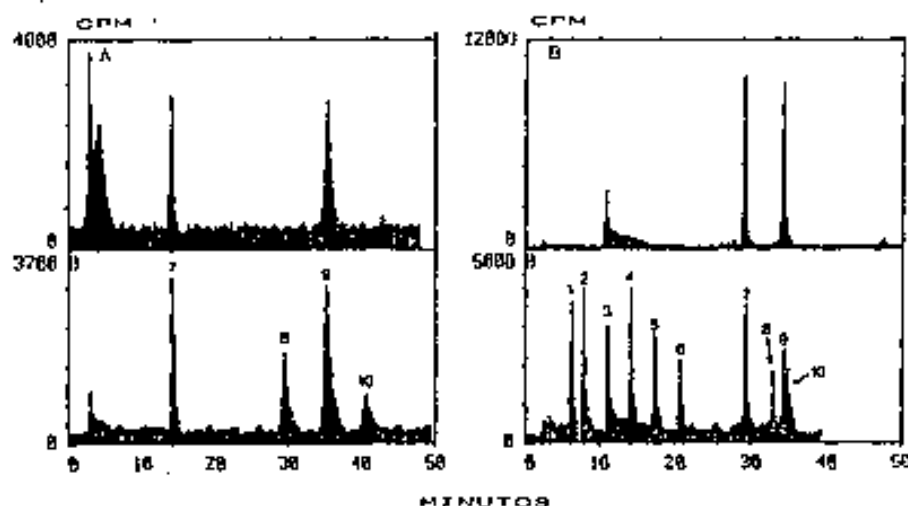


Fig. 2.2.2.1. Cromatograma típico del metabolismo del AA en suspensiones de plaquetas, empleando T1 (a) y T2 (b). Arriba: muestras; abajo: patrones marcados.

La figura 2.2.2.1 muestra un perfil metabólico típico de las

plaquetas incubadas con ^{14}C -AA $50\ \mu\text{M}$ durante 5 minutos, utilizando las dos técnicas cromatográficas descritas en el apartado 4.2.1: T1 (a) y T2 (b). Las muestras se representan en la parte superior de la figura y los patrones auténticos en la parte inferior. A) patrones: 7, HHT; 8, 15-HETE; 9, 12-HETE, y 10, 5-HETE. B) patrones: 1, 6-ceto-PGF_{1 α} ; 2, 20-hidroxi-LTB₄; 3, TXB₂; 4, PGF_{2 α} ; 5 PGE₂; 6, PGD₂; 7, HHT; 8, 15-HETE; 9, 12-HETE y 10, 15-HETE.

En todos los casos se observaron 3 picos mayoritarios que coeluyeron con los patrones de TXB₂, HHT y 12-HETE. En algunos casos (2 psoriásicos y 1 control) se observó además la aparición de picos minoritarios correspondientes a la PGE₂ y PGD₂. No se observaron diferencias significativas en cuanto al perfil metabólico entre ambos grupos. Una vez establecido el patrón metabólico se utilizó únicamente la técnica T2 para el análisis de las muestras.

En la Fig. 2.2.2.2. se ilustra la producción de los diferentes metabolitos en suspensiones de plaquetas humanas en función de la concentración de ^{14}C -AA empleada. A partir de una concentración de AA de $50\ \mu\text{M}$ se alcanzó una meseta en la producción tanto de los prostanoídes como del 12-HETE.

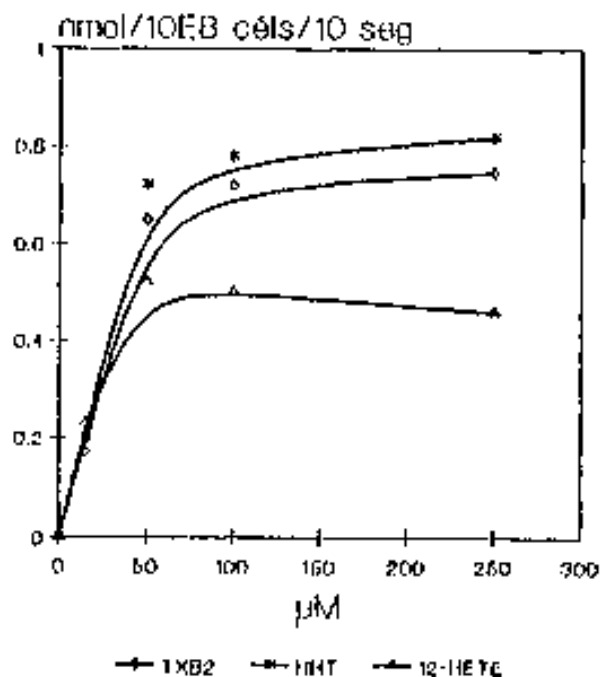


Fig. 2.2.2.2. Producción eicosanoides en función de la [AA] en suspensiones de plaquetas.

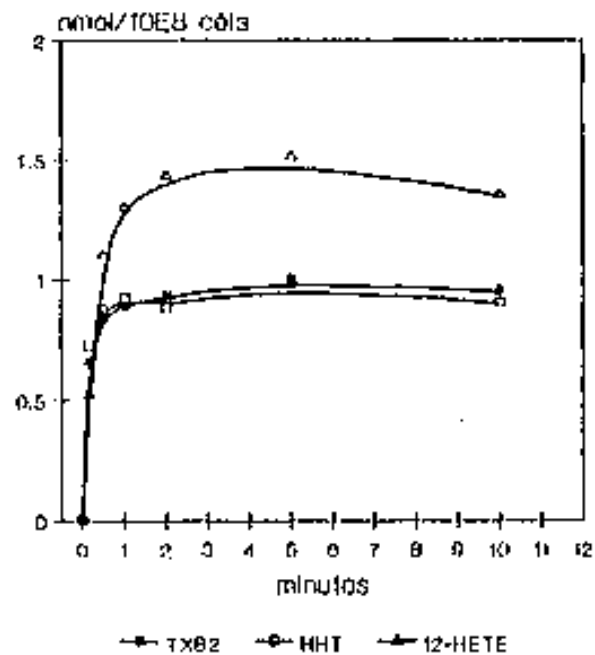
Los datos de la figura 2.2.2.3 muestran que a los 10 segundos de incubación con $50\ \mu\text{M}$ de ^{14}C -AA se estaba en condiciones de velocidad

de biosíntesis máxima, mientras que a los 5 minutos de incubación la producción era máxima. A partir de estos datos se seleccionaron los tiempos de incubación de 10 segundos y 5 minutos a fin de observar diferencias en la velocidad de biosíntesis de los 3 eicosanoides mayoritarios y su producción máxima respectivamente.

Con objeto de estudiar la posible existencia de diferencias en cuanto al metabolismo del AA en plaquetas de pacientes psoriásicos y controles sanos, se efectuó un estudio comparativo cuyos resultados se ilustran en la figura 2.2.2.4.

En la figura 2.2.2.4 se presenta la producción de cada uno de los metabolitos del AA a través de la ciclooxigenasa (TXB₂, HHT) y la 12-lipoxigenasa (12-HETE) en plaquetas de controles y psoriásicos incubadas con 50 μM de AA durante 10 segundos y 5 minutos. Los resultados se expresan en nanomoles de ¹⁴C-AA transformados en cada uno de los productos por 10⁸ plaquetas.

No se observaron diferencias en cuanto a la producción máxima (a los 5 minutos de incubación) de los productos de la ciclooxigenasa, mientras que la producción de 12-HETE por parte de los controles fue mayor (p < 0.01).



50 μM AA

Fig. 2.2.2.3. Time course de la producción de TXB₂, HHT y 12-HETE en suspensiones de plaquetas incubadas con [¹⁴C]-AA 50 μM.

Los resultados de las incubaciones de 10 segundos muestran una mayor velocidad de síntesis de los productos de la ciclooxigenasa en el grupo de psoriásicos, aunque sólo fue significativa la diferencia en la producción de TXB₂ ($p < 0.02$). La velocidad de producción del 12-HETE también fue algo mayor en el grupo de psoriásicos, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

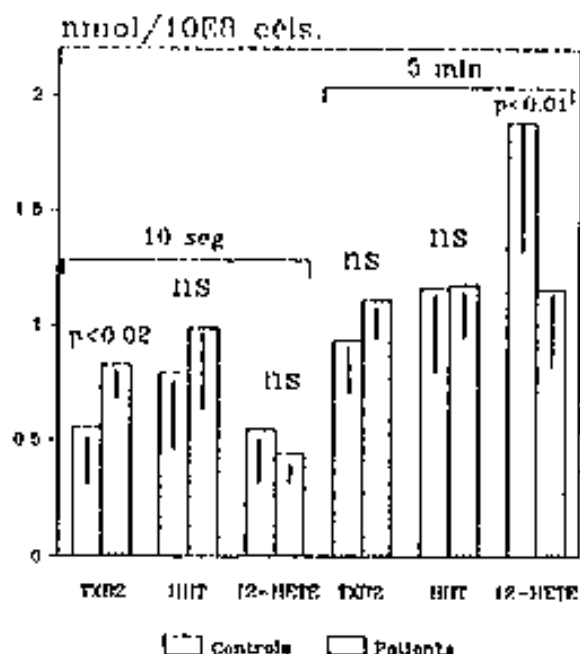


Fig. 2.2.2.4. Estudio comparativo metabolismo AA en plaquetas de psoriásicos y controles.

En este estudio preliminar no se observaron diferencias cualitativas entre los pacientes psoriásicos y los controles en cuanto al patrón metabólico del AA en las plaquetas. La observación más relevante fue la mayor velocidad de producción de los productos de la ciclooxigenasa en el grupo de psoriásicos, que no ha sido previamente descrita. La producción plaquetar de 12-HETE en las muestras incubadas durante 5 minutos fue menor en el grupo de pacientes psoriásicos ($p < 0.01$), debido probablemente a la mayor actividad de la ciclooxigenasa, que determinaría una menor disponibilidad de sustrato (se recuperó menos del 3% del AA inicial al cabo de 1 minuto de incubación) para la 12-lipoxigenasa, que mantiene su actividad durante un periodo más prolongado, como muestra la figura 2.2.2.3.

Nuestros resultados difieren de los de Kraghalla y Fallon [290,

293]. Estos autores observaron un aumento en la producción de 12-HETE y HHT en respuesta al estímulo con ionóforo A23187 1 μ M en suspensiones de plaquetas procedentes de individuos psoriásicos. El ionóforo A23187 aumenta la disponibilidad de Ca^{2+} por parte de las fosfolipasas, que resulta en una liberación del AA esterificado. El aumento en la producción de HHT y 12-HETE en las plaquetas procedentes de pacientes psoriásicos podría venir determinado por un aumento en la liberación de AA en respuesta a dicho estímulo, sin implicar necesariamente una mayor actividad de la ciclooxigenasa o la 12-lipoxigenasa plaquetar en estos pacientes. El mayor incremento en la producción de 12-HETE que de HHT observado por dichos autores podría venir determinado por diferencias en la disponibilidad de sustrato a los tiempos de incubación empleados (15 minutos). A tiempos de incubación prolongados y en presencia de concentraciones elevadas de AA, el balance de producción plaquetar de productos de la ciclooxigenasa y de la 12-lipoxigenasa podría favorecer a esta última.

2.2.3. ESTUDIO COMPARATIVO DEL PERFIL DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LAS SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES PROCEDENTES DE PACIENTES PSORIASICOS Y VOLUNTARIOS SANOS.

Se estudiaron un total de 8 pacientes (6 hombres y 2 mujeres), con edades comprendidas entre 21 y 64 años, afectos de psoriasis en placas crónica estable, con un grado de afectación superior al 10% de la superficie corporal, que no habían recibido ningún tipo de tratamiento durante las dos semanas previas a la extracción. Ninguno de los pacientes era diabético, fumador ni había tomado antiinflamatorios no esteroideos durante las dos semanas previas a la extracción. Se utilizaron un total de 10 voluntarios sanos, no fumadores, con una distribución por sexos y rango de edades similares a los de los pacientes, como controles. Ninguno de los

individuos estudiados había recibido medicación alguna durante las dos semanas anteriores al estudio.

En la Fig. 2.2.3.1 se muestran los cromatogramas UV obtenidos tras la incubación de suspensiones de PMN con A23187 durante 5 minutos. La reacción se detuvo con 0.5 mL de metanol (Fig. 2.2.3.1a), 0.5 mL etanol (Fig. 2.2.3.1b), o HCl pH 3.5 (Fig. 2.2.3.1c), y posteriormente se centrifugaron las muestras a 15000 g durante 1 minuto. El pellet celular se extrajo con 0.5 mL de metanol y se añadió al sobrenadante. El pico 1 coeluyó con los standards de 20-OH-LTB₄ y 20-COOH-LTB₄, los picos 2 y 3 fueron identificados como los dos epímeros 6-trans-LTB₄, y el pico 4 coeluyó con LTB₄ auténtico. La figura 2.2.3.1 reproduce el patrón metabólico del AA en los PMN descrito por Samuelsson [236].

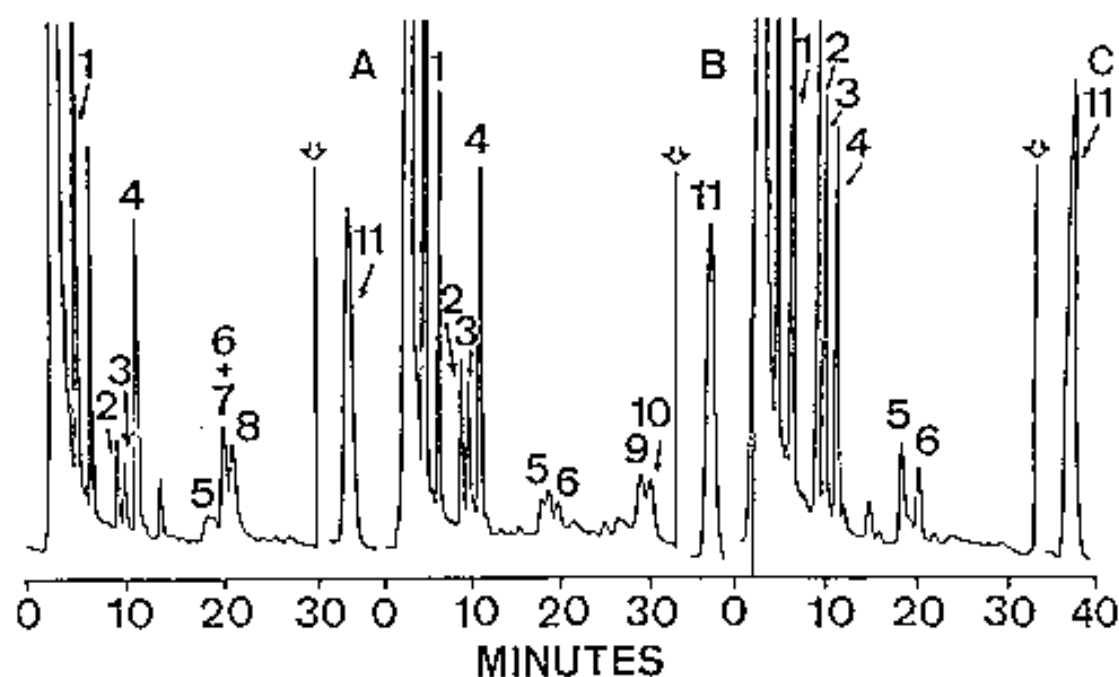


Fig. 2.2.3.1. Metabolismo del AA en PMN humanos, deteniendo la reacción con a) metanol, b) etanol, c) HCl pH 3. Técnica cromatográfica Tl. Longitud de onda antes de la flecha: 280 nm; después, 234 nm.

Comparando nuestros datos con los de Samuelsson [236], llegamos a la conclusión de que los picos 5 y 6 corresponden a los dos epímeros 5,6-diHETE, los picos 7 y 8 corresponden a los epímeros C-12 del Ácido 5(S)-hidroxi-12-metoxi-6,8,10,14-(E,E,E,2)-tetraenoico, los picos 9 y 10 representan los correspondientes derivados 12-etoxi, y el pico 11 corresponde al 5-HETE.

Para efectuar el estudio comparativo empleamos el método de detección radiactiva y detuvimos la reacción con metanol. En la figura 2.2.3.2 se muestra el radiocromatograma correspondiente a las mismas condiciones experimentales que en la figura 2.2.3.1a. La resolución obtenida empleando detección ultravioleta fue mejor que la obtenida empleando detección radiactiva como consecuencia del diseño de la célula de detección. Los picos 2,3 y 5 a 7 representan transformaciones no enzimáticas del LTA₄ y se cuantificaron conjuntamente. Todos los picos numerados fueron inhibidos completamente por la adición de piroprost, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, a la concentración de 100 µM.

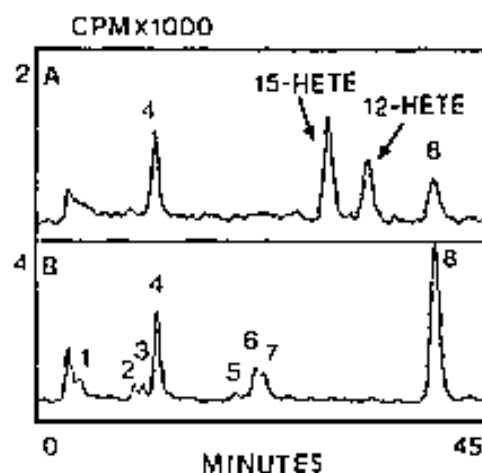


Fig. 2.2.3.2. Cromatogramas utilizando Tl de: a) patrones marcados y b) una muestra de PMN incubados con [¹⁴C]-AA 10 µM y A32187 5 µM durante 5 min. a 37°C.

El curso temporal del metabolismo del AA a través de la 5-lipoxigenasa en suspensiones de PMN procedentes de pacientes psoriásicos e individuos normales se representa en las figuras 2.2.3.3a-2.2.3.3c.

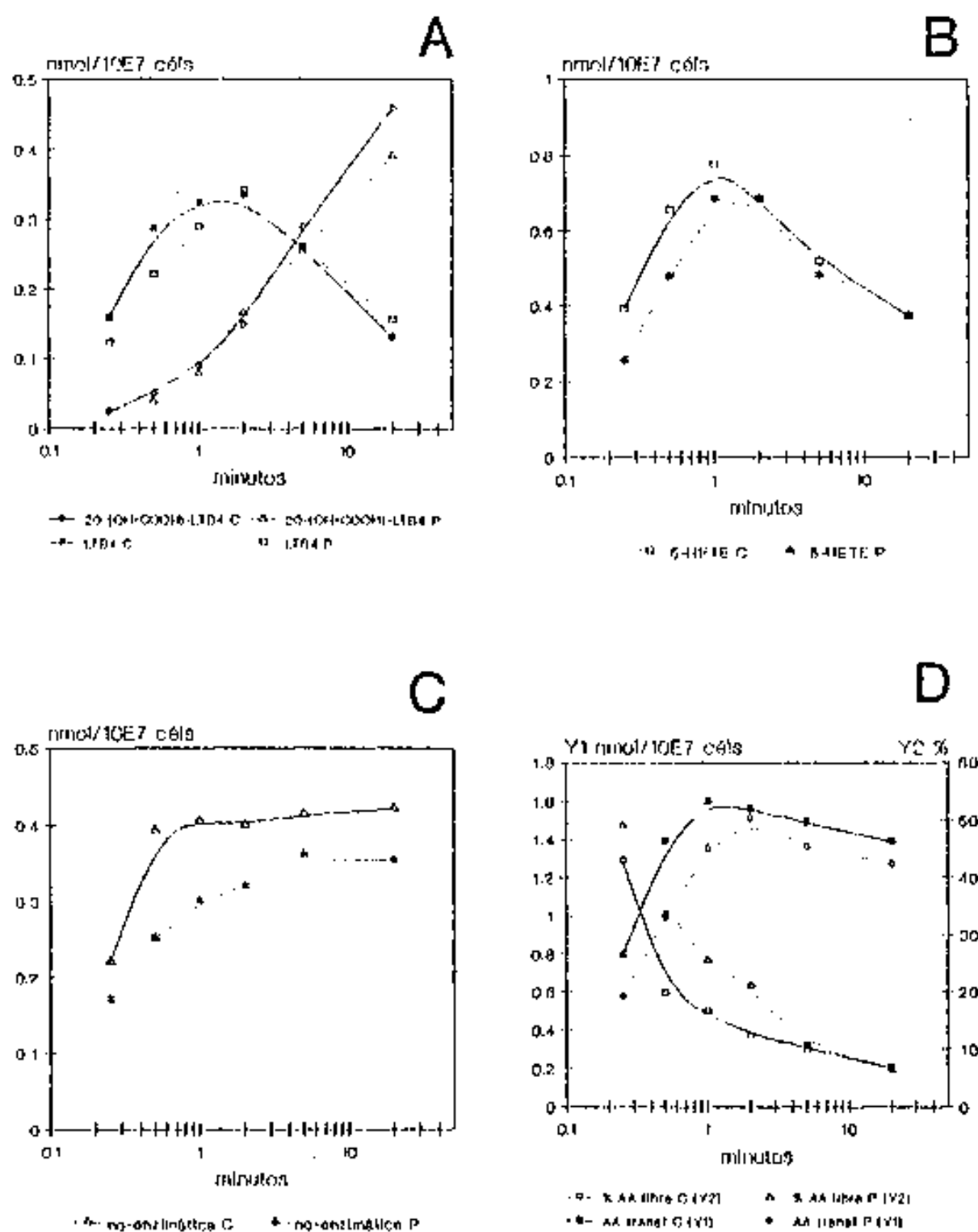


Fig. 2.2.3.3. Estudio comparativo del metabolismo del AA exógeno en PMN procedentes de pacientes psoriásicos (P) y controles (C).

La producción de eicosanoides, en especial los productos no

enzimáticos del LTA_4 , fue ligeramente inferior en el grupo de pacientes psoriásicos, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas para ningún eicosanoide ni tiempo de incubación.

En la figura 2.2.3.3d se representa la actividad total de la 5-lipoxigenasa expresada como la cantidad de ^{14}C -AA que se transformó en la suma de todos los picos radioactivos. Tampoco en este caso se observaron diferencias significativas entre los grupos de psoriásicos y control.

Por lo que respecta a la capacidad ω -oxidativa de las suspensiones de PMN, tampoco se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos de psoriásicos y control.

No se observó diferencia significativa alguna entre las suspensiones de PMN procedentes de pacientes psoriásicos y de voluntarios sanos, por lo que respecta al curso temporal de la biosíntesis de metabolitos del AA tras la adición de sustrato exógeno. Nuestros resultados concuerdan con la conclusión a la que llegaron Ruzicka et al. [283]: los PMN circulantes no presentan un aumento en la actividad de la 5-lipoxigenasa en los pacientes con psoriasis. Nuestros resultados tampoco demuestran un aumento en la capacidad ω -oxidativa de los PMN procedentes de pacientes psoriásicos, lo que concuerda con los resultados de Maurice et al. [286], quienes no encontraron diferencias en los valores aparentes de la K_m y V_m de la 20-hidroxilasa, determinadas en PMN intactos.

Los datos correspondientes a las publicaciones de Maurice et al. [286] y Stüning et al. [287] indican la presencia de un aumento en la biosíntesis de LTB_4 por los PMN procedentes de pacientes psoriásicos, que se manifiesta principalmente en la formación de productos de la ω -oxidación. Maurice et al. [286] estudiaron la

biosíntesis de LTB_4 a partir del AA endógeno y su ω -oxidación. Es posible que el aumento observado en la formación de LTB_4 por parte de los PMN procedentes de pacientes psoriásicos se deba a una mayor hidrólisis del AA incorporado en los fosfolípidos de la membrana celular. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría los datos de Stüning et al. [287], quienes evaluaron la formación de LTB_4 y sus productos de ω -oxidación a partir del AA exógeno, de modo similar al presente estudio. Estos autores observaron que la formación de productos de la ω -oxidación por parte de los PMN procedentes de psoriásicos fue 2.4 veces mayor que en el grupo control. El máximo de producción de LTB_4 tenía lugar a los 10 minutos de incubación, disminuyendo a tiempos de incubación superiores los niveles de LTB_4 producidos. Sin embargo, la pendiente de la curva de formación de productos de la ω -oxidación era más pronunciada en el caso de los PMN procedentes de pacientes psoriásicos, mientras que las pendientes de las curvas que reflejaban la disminución de los niveles de LTB_4 en función del tiempo eran aproximadamente iguales. Ello implica que en el grupo de psoriásicos la tasa de biosíntesis de LTB_4 era superior a la del grupo control. Esta diferencia, caso de ser apreciable, se podría observar incluso al cabo de tiempos de incubación cortos, cuando la formación de productos de la ω -oxidación es aún despreciable. El tiempo de incubación más corto que emplearon Stüning et al. [287] fue de 2 minutos, demasiado prolongado como para poder apreciar la tasa neta de biosíntesis de LTB_4 . En nuestros experimentos no pudimos observar ninguna diferencia significativa en cuanto a la formación de LTB_4 tras incubaciones de 15 segundos de duración.

En síntesis, los resultados de nuestro estudio preliminar indican que no existen diferencias cualitativas en cuanto al metabolismo del AA exógeno en suspensiones de plaquetas o de PMN procedentes de pacientes psoriásicos o voluntarios sanos, y que las principales vías metabólicas del AA activas en las suspensiones de células epidérmicas humanas (12-lipoxigenasa y ciclooxigenasa) están

representadas en las suspensiones de plaquetas.

En consecuencia, las suspensiones de PMN y de plaquetas procedentes de voluntarios sanos constituyen un modelo adecuado para la realización de estudios farmacológicos destinados a evaluar el efecto de los fármacos sobre el metabolismo del AA y sus posibles implicaciones en relación con la patofisiología y la terapéutica de la psoriasis.

3. OBJETIVOS

El estudio de la modulación farmacológica y dietética del metabolismo del ácido araquidónico en diversos tipos celulares y sus implicaciones terapéuticas en la psoriasis, que constituye el objeto de la presente tesis, se concreta en los siguientes objetivos principales:

- 1) Estudiar el efecto del piriprost y el lonapalene, dos fármacos inhibidores de la 5-lipoxigenasa de soja, sobre el metabolismo del ácido araquidónico en suspensiones de leucocitos polimorfonucleares y de plaquetas humanas, por ser el perfil metabólico de éstas representativo de las vías mayoritarias del metabolismo del ácido araquidónico en los queratinocitos (12-lipoxigenasa y ciclooxigenasa), a fin de evaluar las posibles implicaciones de su empleo terapéutico.
- 2) Estudiar el posible efecto de diversos imidazoles sobre el metabolismo del ácido araquidónico en suspensiones de leucocitos polimorfonucleares y plaquetas humanas, por ser su perfil metabólico representativo de las vías (5-lipoxigenasa, 12-lipoxigenasa y ciclooxigenasa) capaces de intervenir en la fisiopatología de la psoriasis, la dermatitis seborreica y diversas dermatosis inflamatorias.
- 3) Estudiar el posible efecto de la ciclosporina, agente inmunosupresor eficaz en el tratamiento de la psoriasis, sobre el metabolismo del ácido araquidónico en células epidérmicas y fibroblastos humanos, intentando correlacionar los datos obtenidos con el efecto antiproliferativo del fármaco, que podría ser un mecanismo de acción complementario de la ciclosporina en el tratamiento de la psoriasis.

- 4) Efectuar un estudio clínico, de asignación randomizada a doble ciego, de la eficacia del tratamiento dietético durante 8 semanas con aceite de pescado rico en ácido eicosapentaenoico comparado con aceite de oliva en pacientes con psoriasis crónica en placas moderada y estable, correlacionando la respuesta clínica con los parámetros histopatológicos y bioquímicos, con especial referencia al metabolismo del ácido araquidónico en suspensiones de leucitos polimorfonucleares y plaquetas procedentes de sangre periférica extraída de los pacientes al principio y al final del período de tratamiento.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1. OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

4.1.1. OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.

Para la realización de los estudios farmacológicos se efectuaron extracciones de sangre venosa periférica obtenida en ayunas de voluntarios sanos. Ninguno de los individuos empleados como donantes había recibido medicación alguna durante las dos semanas anteriores a la extracción.

4.1.2. PREPARACION DE SUSPENSIONES DE PLAQUETAS.

Se procedió a la extracción de muestras de sangre venosa periférica, anticoagulada con ACD-A, procedente de donantes voluntarios sanos. Ninguno de los controles era fumador ni había recibido medicación alguna durante las 2 semanas previas a la extracción. La sangre se centrifugó a 200 g durante 12 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante (plasma rico en plaquetas (PRP)) se mantuvo a 4°C hasta el momento de su análisis. Se prepararon suspensiones de plaquetas lavadas empleando la técnica descrita por DiMinno et al. [451]. Las resuspensiones finales se efectuaron en tampón Tyrode pH 7.4 (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5 mM D-glucosa y 10 mM HEPES (Sigma)). La concentración celular se ajustó a 10⁶ plaquetas/ μ L y se añadió MgCl₂, concentración final 0.5 mM. Los recuentos de plaquetas se efectuaron en un contador celular (Coulter Electronics Ltd.).

4.1.3. PREPARACION DE SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Una vez separado el PRP, se añadió solución salina de dextrano t-500 al sedimento, a fin de obtener una concentración final de 0.6%

p/v, y se dejó sedimentar durante 40 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se centrifugó a 180 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet resultante se resuspendió en 5 mL de tampón Hank pH 7.4. Tras la adición de 3 mL de Lymphoprep (Nycomed AS), la suspensión se centrifugó a 450 g durante 30 minutos. Se desecharon las capas del sobrenadante, incluyendo una banda que contiene monocitos y plaquetas. Se procedió a la lisis de los eritrocitos presentes en el pellet añadiendo 2 mL de agua destilada; al cabo de 45 segundos se restauró la isotonicidad añadiendo 2 mL de solución salina 2x. El volumen resultante se ajustó a 10 mL con tampón Hank pH 7.4. Se procedió a una centrifugación a 180 g durante 10 minutos, eliminación del sobrenadante y resuspensión del pellet en 1-2 mL de tampón Hank pH 7.4. La concentración celular se determinó por recuento en un hemocitómetro empleando el sistema de microcolección Unopette (Becton-Dickinson) para evaluar la contaminación plaquetar. La concentración celular se ajustó a 2×10^7 PMN/mL con tampón Hank pH 7.4, y se añadió CaCl_2 hasta alcanzar una concentración final de 1.5 mM.

4.1.4. PREPARACION DE SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS.

Las células epidérmicas se obtuvieron a partir de fragmentos de piel humana, procedentes de operaciones de cirugía estética y plástica, utilizando la técnica descrita por Liu y Karasek [452]. Se cortaron tiras de piel mediante una hoja de afeitar fijada a una guarda metálica, guiada manualmente, y se lavaron dos veces en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} pH 7.4 (PBSS). Las tiras obtenidas se sumergieron en una solución de tripsina al 0.5 % p/v en PBSS y se mantuvieron a 37°C durante 50-60 minutos. Cuando se produjo la separación de la epidermis, las tiras de epidermis se transfirieron a un medio de cultivo (DNEM (Flow laboratories) + 2mM glutamina + 1 mM piruvato sódico) que contenía un 10 % v/v de suero bovino fetal (SBF). Posteriormente los fragmentos de epidermis se trocearon y

se agitaron suavemente en el seno de una solución de medio de cultivo, con la misma composición descrita anteriormente, durante 10-15 minutos. Se filtró la suspensión obtenida para separar los fragmentos de piel entera. La suspensión obtenida mediante esta técnica se enriqueció efectuando el mismo tratamiento con fragmentos de la dermis, para liberar los queratinocitos de las capas más superiores de aquélla. La suspensión celular obtenida se mantuvo a 37°C hasta la realización de las incubaciones con AA. El conteo celular se realizó mediante hemocitómetro y la viabilidad celular se valoró mediante la técnica de exclusión por tinción con azul de Tripan. Se descartaron las suspensiones en las que se observó una mortalidad superior al 5%.

4.1.5. AISLAMIENTO Y PUESTA EN CULTIVO DE FIBROBLASTOS DERNICOS.

Una vez separada la dermis de la epidermis como se ha descrito, los fibroblastos procedentes de los fragmentos de dermis se obtuvieron mediante el tratamiento de éstos con colagenasa tipo IV (200 U/mL) en medio DMEM + glutamina 2 mM + piruvato sódico 1 mM durante 1-2 horas. Las células así obtenidas se utilizaron para iniciar un cultivo. Se filtró el incubado a través de gasa estéril y se centrifugó la suspensión celular obtenida a 280 g durante 10 minutos. Las células se sembraron en recipientes para cultivo celular (frascos de 25 o 75 cm² o placas de 6 pocillos) a una concentración mínima de 10⁴ células/mL, en medio de cultivo completo, y se incubaron a 37°C en una estufa de cultivos Heraeus con atmósfera de CO₂ controlada (5%). Cuando las células alcanzaron el estado de confluencia se lavaron 2 veces con PBS y se sometieron a la acción de la tripsina (0.1% p/v en PBS) durante 10-15 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo las células se liberaron del frasco de cultivo y se sembraron de nuevo a razón de 1:3 (pase 1). Cada subdivisión incrementó en una unidad el número de subcultivo (pase) de las células.

4.2. ANALISIS DE EICOSANOIDES EN LAS MUESTRAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

Aparatos. Se emplearon tres equipos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):

A) Estuvo compuesto de un programador de gradientes Kontron 205, 2 bombas Kontron T-414 (mezcla a alta presión), detector UV Kontron Uvikon 735LC y un detector de radioactividad Beckman 175 provisto de una célula de centelleo líquido (Fig. 4.2.1). El líquido de centelleo (Unisolve, Koch-light o Ready Flow III, Beckman) fue bombeado a 3 ml/minuto por una bomba Beckman 110B.

B) Compuesto por un programador de gradientes Spectra-Physics SP 5700, 1 bomba Spectra-Physics asociada (mezcla a baja presión), detector UV-Vis Beckman 165 y un detector radioisotópico como el descrito para el equipo anterior.

C) Compuesto por 2 bombas Beckman 165 (mezcla a alta presión), detector UV-Vis Beckman 165 y un detector radioisotópico como el descrito para el equipo A. la formación de gradientes se comandó mediante el programa System Gold de Beckman en un ordenador Epson AT asociado a una interfase.

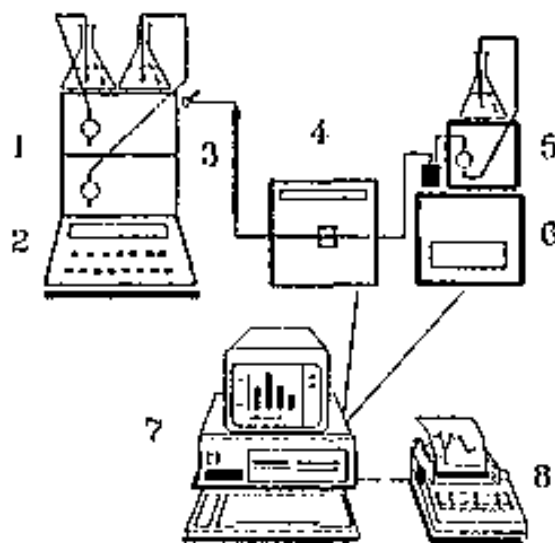


Fig. 4.2.1. Equipo HPLC. 1: bombas; 2: programador gradientes; 3: columnas; 4: detector UV-Vis; 5: bomba líquido centelleo; 6: detector; 7: ordenador; 8: impresora.

Patrones. 6-ceto-[5,8,9,11,12,14,15(n)-³H]-Prostaglandina F_{2α}, 157 Ci/mmol, [5,6,11,12,14,15(n)-³H]-Prostaglandina E₂, 185 Ci/mmol, [5,6,8,9,12,14,15 (n)-³H]-Prostaglandina D₂, 193 Ci/mmol, [1-¹⁴C]-Prostaglandina F_{2α}, 60 mCi/mmol, [5,6,8,9,11,12,14,15 (n)-³H]-Tromboxano B₂, 120 Ci/mmol, ácido 5(S)-hidroxi-[5,6,8,11,12,14,15 (n)-³H]-eicosatetraenoico, 183 Ci/mmol, ácido 12(S)-hidroxi-[5,6,8,11,12,14,15(n)-³H]-eicosatetraenoico, 119 Ci/mmol, ácido 15(S)-hidroxi-[5,6,8,11,12,14,15(n)-³H]-eicosatetraenoico, 285 Ci/mmol, suministrados por Amersham. Ácido 12-L-hidroxi-[5,6,8,9,11,12(n)-³H]-5,8,10-heptadecatrienoico, 129 Ci/mmol, [5,6,8,11,12,14,15(n)-³H]-leucotrieno B₄, 200 Ci/mmol, 20-[14,15(n)-³H]-hidroxileucotrieno B₄, 52 Ci/mmol, suministrados por New England Nuclear. Prostaglandina B₂, suministrada por Sigma. 20-COOH-LTB₄, donación del Dr. Ruzicka (Universidad de Munich).

Técnica de desarrollo cromatográfico 1 (T1). Se equilibró durante 15 minutos una columna de fase reversa C-18 (Ultrasphere ODS 250 x 4.6 mm, partícula de 5µm esférica, Beckman) con una mezcla de metanol:agua:trietilamina:ácido trifluoroacético 75:25:0.05:0.1 (acetonitrilo, ChromAR HPLC, Mallinckrodt; metanol, HPLC, Scharlau, ácido trifluoroacético, espectroscopia, Merck; trietilamina, Analyticals, Carlo Erba), bombeado a 1 ml/minuto. Posteriormente se inyectaron los volúmenes correspondientes de los sobrenadantes de las incubaciones (100, 200 o 500 µl de suspensiones de plaquetas, PMN o células epidérmicas, respectivamente). La cromatografía se realizó en régimen isocrático durante 45 minutos, tras los cuales se procedió a un lavado de 15 min con metanol:agua:trietilamina:ácido trifluoroacético 90:10:0.05:0.1 para la elución de los lípidos retenidos.

Técnica de desarrollo cromatográfico 2 (T2). Eluyentes: A) acetonitrilo:agua a pH 3.4 (con ácido acético) 33:67 y B) acetonitrilo:agua pH 3.4 9:1. Después de 15 minutos de equilibramiento con

eluyente A, se inyectaron los volúmenes correspondientes de los sobrenadantes de las incubaciones (100, 200 o 500 µl de suspensiones de plaquetas, PMN o células epidérmicas, respectivamente) en una columna C-18 (Ultrasphere JP 25 cm, Beckman). Durante los 16 primeros minutos después de la inyección la composición de la fase móvil fue 100 % de A. Entonces se incrementó el porcentaje de B linealmente hasta alcanzar el 65% en el minuto 26 y se matuvo la misma composición del eluyente hasta los 40 minutos. Posteriormente la columna se lavó durante 15 minutos con el eluyente B. El flujo de la fase móvil fue durante todo el desarrollo cromatográfico de 1 mL/minuto.

Técnica de desarrollo cromatográfico 2.1 (T2.1). Se utilizaron los mismos eluyentes y columnas que en el apartado anterior. La cromatografía se realizó en régimen isocrático con un 100% de A durante los primeros 10 minutos. Posteriormente se lavó la columna con un 100% de B durante 15 minutos.

Proceso de datos. La identificación de los eicosanoides formados se realizó por coelución con los patrones auténticos. La integración de los picos cromatográficos se realizó utilizando dos programas: el 171 Radioisotope Detector Chromatographics Software y el System Gold (Beckman), en un IBM-PC XT 286 o Epson AT acoplado a los detectores de centelleo o UV-Vis de los equipos. Los resultados cuantitativos se expresan en nmoles de ¹⁴C-AA transformado en cada uno de los picos, tras corregir las cpm para la eficacia de recuento y la actividad específica de la mezcla de AA-marcado y no marcado empleada en cada caso.

4.3. ESTUDIOS DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN DIVERSOS TIPOS CELULARES.

4.3.1. PLAQUETAS.

A fin de establecer el patrón metabólico del AA exógeno en suspensiones de plaquetas humanas y su posible modificación por efecto de los fármacos, se preincubaron alícuotas de 1 mL de suspensiones plaquetarias durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron 5 µl de una solución etanólica de ¹⁴C-AA (Amersham, 56.6 mCi/mmol), a una concentración final de 15 µM. Al cabo de 5 minutos a 37 °C se paró la reacción añadiendo 1 mL de metanol a 0 °C. Las muestras se matuvieron en baño de agua-hielo hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se mantuvo a -80 °C hasta su posterior análisis mediante la técnica T2.

Se efectuaron estudios preliminares para determinar la concentración de ¹⁴C-AA y tiempos de incubación óptimos para la realización de los estudios farmacológicos: A) Para determinar la concentración óptima de AA, se preincubaron alícuotas de 1 mL de las suspensiones de plaquetas durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron 5 µl de una solución etanólica conteniendo 0.566 µCi de ¹⁴C-AA y cantidades variables de AA frío (Sigma) para obtener concentraciones finales de 15, 50, 100 y 250 µM. Al cabo de 10 segundos de incubación a 37 °C se paró la reacción, procesándose las muestras como se ha descrito en el párrafo anterior. B) La selección de los tiempos de incubación se realizó preincubando muestras de 7 mL de suspensión de plaquetas (procedentes de 3 voluntarios sanos) durante 5 minutos a 37 °C en agitación suave. Posteriormente se añadieron 35 µl de una solución etanólica conteniendo 3.96 µCi de ¹⁴C-AA y AA frío para obtener una concentración final de 50 µM. A diversos intervalos de tiempo se transfirieron alícuotas de 1 mL de la suspensión a tubos que contenían 1 mL de metanol a 0 °C. El

procesamiento posterior de las muestras se realizó como se ha descrito anteriormente.

4.3.2. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Se preincubaron muestras de 4 ml. de suspensiones de PMN a 37°C durante 5 minutos en condiciones de agitación suave, añadiéndose posteriormente 20 µl. de una solución etanólica que contenía 2.26 µCi de ¹⁴C-AA (concentración final 10 µM). Al cabo de diversos intervalos de tiempo se transfirieron alícuotas de 0.5 ml. de la suspensión a tubos que contenían 0.5 ml. de metanol a 0°C. Las muestras se procesaron como se ha descrito anteriormente hasta su análisis. La formación de LTD₄ y 5-HETE se analizó empleando la técnica T1, y la formación conjunta de 20-OH-LTD₄ y 20-COOH-LTD₄ mediante la técnica T2.

4.3.3. SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS.

A fin de determinar el patrón metabólico del AA, las suspensiones de células epidérmicas en medio de cultivo (n=10) se centrifugaron a 250 g durante 10 minutos. Posteriormente se resuspendieron en RPMI 1640 (Flow Laboratories) con una concentración de Ca²⁺ 1 mM a una concentración final de 10⁷ células vivas/ml. Al cabo de 5 minutos de preincubación de alícuotas de 1 ml. a 37°C, se añadió ¹⁴C-AA (Amersham, 56.6 mCi/mmol) disuelto en 5 µl. de etanol, concentración final 10 µM. Al cabo de 10 minutos a 37°C se paró la reacción añadiendo 1 ml. de metanol a 0°C. Las muestras se matuvieron en baño de agua-hielo hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos. El sobrenadante se mantuvo a -80°C hasta su posterior análisis. También se realizaron incubaciones añadiendo simultáneamente al ¹⁴C-AA 5 µM de ionóforo A23187 (Sigma) o 10 µM de PAF-acéter (Sigma), preincubando las muestras durante 5 min en ausencia o presencia de indometacina 50 µM (Sigma). En esta parte del estudio se emplearon

las técnicas T1 y T2.

4.3.4. FIBROBLASTOS EN CULTIVO.

Los fibroblastos en estado de confluencia reciente de 5 frascos de 25 cm² (pase 6), procedentes de pieles de 3 individuos distintos por grupo (controles y pacientes con psoriasis en placas crónico estable con una afectación superior al 10% de la superficie corporal) y experimento, se lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente se añadieron 1.5 mL de RPMI 1640 y se mantuvieron a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente se añadieron 5 µL de una solución etanólica que contenía 0.7 µCi de ¹⁴C-AA (concentración final 25µM) y ionóforo A23187 (concentración final 5 µM). Al cabo de 15 minutos a 37°C se paró la reacción añadiendo HCl 1 N hasta pH 3.5 y se mantuvieron en hielo-agua durante 1 minuto, añadiéndose posteriormente 1 volumen de etanol a 0°C. El líquido se transfirió a un tubo y se centrifugó a 15000 g durante 2 minutos. El sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su análisis. Para ello se inyectaron 500 µL de las muestras en la columna utilizando la técnica T2 (apartado 4.2) para su análisis.

4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA (PIRIPROST, LONAPALENE) SOBRE OTRAS VÍAS DEL ÁCIDO ARÁQUIDÓNICO ACTIVAS EN SUSPENSIONES DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS Y DE PLAQUETAS.

Fármacos. Se emplearon piriprost, donado gentilmente por Upjohn Co. (Kalamazoo U.S.A.), lonapalene, donado gentilmente por Syntex (Palo Alto, U.S.A.), indometacina y aspirina. Se disolvieron los fármacos en polvo en alcohol absoluto (etanol) a las concentraciones adecuadas (máximas), y se emplearon alícuotas de estas soluciones para preparar las diversas concentraciones de los fármacos que se emplearon en las incubaciones en cada experimento, efectuándose

diluciones paralelas del disolvente para emplearlas como control.

Efecto del piroprost y el lonapalene sobre el metabolismo del AA en suspensiones de PMN. Con el fin de confirmar el efecto inhibitorio del lonapalene y el piroprost sobre la 5-lipoxigenasa en suspensiones de PMN, se procedió a la obtención de suspensiones de PMN, procedentes de voluntarios sanos, según el método descrito en 4.1.3. Se incubaron por quintuplicado alícuotas de 0.5 mL de suspensiones de PMN durante 5 minutos a 37°C, en presencia o ausencia de lonapalene (5, 10 o 50 µM) o piroprost (50, 100 o 200 µM), disueltos en 5 µL de etanol. Después de los 5 minutos de incubación, se añadieron simultáneamente 8.8 µL de ¹⁴C-AA (concentración final 15 µM, 58.3 mCi/mmol, Amersham) y 2.5 µL de una solución etanólica de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 5 µM), con el objeto de activar la 5-lipoxigenasa. La reacción se paró 5 minutos después con 0.5 mL de metanol frío (0°C) y las muestras se mantuvieron en baño de hielo-agua, hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo anteriormente mencionado en la sección 4.2. y el método de desarrollo cromatográfico T1 y T2.1 (a fin de separar los productos de la oxidación del LTA₄ del frente de solvente).

Efecto del piroprost y el lonapalene sobre el metabolismo del AA en suspensiones de plaquetas. Se procedió a la obtención de suspensiones de plaquetas, procedentes de voluntarios sanos, según el método descrito en 4.1.2. Se incubaron alícuotas de 0.5 mL de suspensión plaquetar durante 5 minutos a 37°C, con diferentes concentraciones de piroprost (10, 100 µM), lonapalene (1, 10, 25, 30, 50, 60, 100, 200 µM) o indometacina (10, 25, 50, 100, 200 nM) disueltos en 5 µL de etanol. Después de los 5 minutos de incubación, se añadieron 8.8 µL de ¹⁴C-AA (concentración final 15 µM, 58.3 mCi/mmol, Amersham). La reacción se paró 5 minutos después con 0.5

ml de metanol frío (0°C) y las muestras se mantuvieron en baño de hielo-agua, hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo anteriormente mencionado en la sección 4.2. y el método de desarrollo cromatográfico T2.

Efecto del tiempo de incubación con lonapalene sobre la inhibición de la ciclooxigenasa en plaquetas humanas. Con el fin de evaluar el patrón de inhibición de la ciclooxigenasa por parte del lonapalene en comparación con otros dos inhibidores conocidos, la aspirina y el lonapalene, se incubaron alícuotas de 0.5 ml de suspensiones de plaquetas por duplicado en presencia de lonapalene 30 µM, indometacina 50 nM y aspirina 10 µM durante diferentes períodos de tiempo (10 segundos, 1, 2, 5, 10 y 15 minutos), antes de la adición de ácido ¹⁴C-araquidónico, procesándose las muestras posteriormente según se ha indicado.

4.5. IMIDAZOLES

Fármacos. Se emplearon bifenazol, clotrimazol y ketoconazol, donados gentilmente por Bayer (Wuppertal, RFA). Se disolvieron los fármacos en polvo en alcohol absoluto (etanol) a las concentraciones adecuadas (máximas), y se emplearon alícuotas de estas soluciones para preparar las diversas concentraciones de los fármacos que se emplearon en las incubaciones en cada experimento, efectuándose diluciones paralelas del disolvente para emplearlas como control.

4.5.1. EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRIMAZOL Y KETOCONAZOL SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Se procedió a la obtención de suspensiones de PMN, procedentes de voluntarios sanos, según el método descrito en 4.1.3. Se incubaron por quintuplicado alícuotas de 0.5 ml. de suspensiones de PMN durante 5 minutos a 37°C, con diferentes concentraciones de bifonazol (5, 10, 50 µM), clotrimazol (5, 10, 50 µM) y ketoconazol (20, 75, 150, 200 µM), disueltos en 5 µl. de etanol. Después de los 5 minutos de incubación, se añadieron simultáneamente 8.8 µl. de ¹⁴C-AA (concentración final 15 µM, 58.3 mCi/mmol, Amersham) y 2.5 µl. de una solución etanólica de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 5 µM), con el objeto de activar la 5-lipoxigenasa. La reacción se paró 5 minutos después con 0.5 ml. de metanol frío (0°C) y las muestras se mantuvieron en baño de hielo-agua, hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos a 4°C. Para evaluar el posible efecto inhibitorio de bifonazol, clotrimazol y ketoconazol sobre la ω-oxidación del LTB₄ exógeno en los PMN, se incubaron por quintuplicado alícuotas de 0.5 ml. de suspensiones de PMN durante 5 minutos a 37°C, en presencia de dos concentraciones (50 y 200 µM) de cada uno de los fármacos, disueltos en 5 µl. de etanol. Después de los 5 minutos de incubación, se añadió [³H]-LTB₄ (0.135 µCi, concentración final 8 nM) exógeno, deteniéndose la reacción 5 minutos después con 0.5 ml. de metanol frío (0°C) y procesándose las muestras del modo descrito anteriormente. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo anteriormente mencionado en la sección 4.2. y los métodos de desarrollo cromatográfico T1 y T2.1 (a fin de separar los productos ω-oxidados del LTB₄ del frente de solvente).

4.5.2. EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRIMAZOL Y KETOCONAZOL SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE PLAQUETAS.

Se procedió a la obtención de suspensiones de plaquetas, procedentes de voluntarios sanos, según el método descrito en 4.1.2. Se incubaron por quintuplicado alícuotas de 0.5 mL de suspensión plaquetar durante 5 minutos a 37°C, con diferentes concentraciones de bifonazol (10, 50, 100 µM), clotrimazol (10, 50, 100 µM) y ketoconazol (100, 200, 500 µM), disueltos en 5 µL de etanol. Después de los 5 minutos de incubación, se añadieron 8.8 µL de ¹⁴C-AA (concentración final 15 µM, 58.3 mCi/mmol, Amersham). La reacción se paró 5 minutos después con 0.5 ml. de metanol frío (0°C) y las muestras se mantuvieron en baño de hielo-agua, hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo anteriormente mencionado en la sección 4.2. y el método de desarrollo cromatográfico T2.

4.5. CICLOSPORINA A

Se procedió al estudio del efecto de la ciclosporina en incubaciones a corto plazo sobre suspensiones de células epidérmicas humanas y a largo plazo sobre cultivos de fibroblastos dérmicos humanos.

Fármaco. Se empleó ciclosporina donada gentilmente por Sandoz Ltd. (Basilea, Suiza). Se disolvió la ciclosporina en polvo en alcohol absoluto (etanol) a una concentración de 10 mg/mL, empleándose alícuotas de esta solución para preparar las diversas concentraciones de fármaco (1, 5 y 10 µg/mL) en el medio de cultivo. Se efectuaron diluciones paralelas del etanol utilizado como disolvente para emplearlas como control.

4.6.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSTIONES DE CELULAS EPIDERMICAS HUMANAS.

Se procedió a la obtención de suspensiones de células epidérmicas humanas según la técnica descrita en el apartado 4.1.4.

Incubación con ^{14}C -AA. A fin de determinar el patrón metabólico del AA y su posible modulación por la ciclosporina, las suspensiones de células epidérmicas en medio de cultivo ($n=10$) se centrifugaron a 900 g durante 10 minutos. Posteriormente se resuspendieron a una concentración final de 2.2×10^7 células vivas/ml en DMEM + 20 mM Hepes pH = 7.4 + Ca^{2+} 1 mM. Se preincubaron alícuotas de 1 mL a 37°C durante 10 minutos, en ausencia o presencia de ciclosporina a las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A continuación se añadió ^{14}C -AA (Amersham, 56.6 mCi/mmol) disuelto en 5 μL de etanol, concentración final 10 μM y 5 μM de ionóforo A23187 (Sigma). Al cabo de 10 minutos de incubación a 37°C, se paró la reacción añadiendo 30 μL de HCl 1 N y 1 mL de metanol a 0°C. Las muestras se matuvieron en baño de agua-hielo hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos. El sobrenadante se mantuvo a -80°C hasta su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo y técnica T2 descritos en el apartado 4.2.

4.6.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE DERMIS HUMANA.

En un estudio preliminar se observó la identidad del metabolismo del AA exógeno por fibroblastos dérmicos humanos en cultivo (pase 6), procedentes de lesiones de pacientes psoriásicos ($n=3$) o procedentes de piel sana de controles ($n=3$). Debido a su mayor disponibilidad se emplearon estos últimos, una vez se hubo comprobado que

no existieran diferencias entre ambos. Se emplearon las técnicas de obtención de fibroblastos, puesta en cultivo y estudio del metabolismo del AA descritas en los apartados 4.1.5 y 4.3.4.

Efecto de la ciclosporina sobre la viabilidad celular en cultivos de fibroblastos procedentes de dermis humana normal. Para este estudio se utilizaron fibroblastos humanos en cultivo en fase 7. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 0.5×10^5 céls./mL y se cultivaron con 2 ml de medio completo (DMEM + 2 mM glutamina + 1 mM piruvato sódico + 10% v/v de suero bovino fetal (SBF) a 37°C en atmósfera de CO₂. Cuando se alcanza el estado de confluencia reciente (6×10^5 céls./pocillo) las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio fresco sin suero y en presencia de diferentes concentraciones de ciclosporina (0, 1, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL). Tras 24 horas de exposición se realizó un conteo por triplicado de cada concentración valorándose la mortalidad por exclusión con azul Tripán.

Incubación con ¹⁴C-AA. A fin de determinar el patrón metabólico del AA y su posible modulación por la ciclosporina, se efectuó un estudio metabólico por duplicado. Para este estudio se utilizaron igualmente fibroblastos humanos en cultivo en fase 7. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 0.5×10^5 céls./ml y se cultivaron con 2 ml de medio completo (DMEM + 2 mM glutamina + 1 mM piruvato sódico + 10% v/v de suero bovino fetal (SBF) a 37°C en atmósfera de CO₂. Cuando se alcanzó el estado de confluencia reciente (6×10^5 céls./pocillo) las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 24 horas en medio fresco sin suero y en presencia de diferentes concentraciones de ciclosporina que no causaran mortalidad celular aparente (0, 1, 2.5 y 5 µg/ml). Al cabo de 24 horas, las células se lavaron con PBS y se incubaron en 0.4 ml de medio sin suero y en presencia de ¹⁴C-AA (54.5 µCi/nmol, Amersham), concentración final 25 µM y ionóforo de calcio A23187 5 µM a 37°C. Al cabo de 15 minutos, la reacción se detuvo añadiendo

30 µl de HCl 1 N y 0.4 ml de metanol a 0°C. Las muestras se mantuvieron en baño de agua-hielo hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos. El sobrenadante se mantuvo a -80°C hasta su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo y técnica T2 descritos en el apartado 4.2.

4.7. PROTOCOLO ACIDO RICOSAPENTAENOICO

Diseño del estudio. Se procedió a un estudio randomizado, a doble ciego, de 11 semanas de duración, en 18 pacientes con psoriasis en placas crónico extenso estable, comparando el efecto de la administración diaria de 12 g de aceite de pescado rico en EPA (2.59 g/día) con la administración de idéntica cantidad de aceite de oliva, envasados en forma de cápsulas de 1 g.

Pacientes. El período de admisión de pacientes en el estudio estuvo comprendido entre Mayo de 1988 y Mayo de 1990. Completaron el estudio 18 pacientes (15 hombres y 3 mujeres) de edades comprendidas entre 14 y 75 años, con psoriasis vulgar crónica en placas, estable durante por lo menos 2 semanas, y moderado, con un PASI al inicio comprendido entre 10 y 50. Fueron criterios de exclusión la presencia de psoriasis guttata, pustulosa o eritrodérmica, embarazo, diabetes, dislipemia, trombopatía o tratamiento con corticosteroides, antiinflamatorios no esteroideos y otros fármacos capaces de interferir con el metabolismo del AA. Los pacientes suspendieron todo tratamiento tópico o sistémico de su psoriasis durante 4 u 8 semanas respectivamente antes de entrar en el estudio. El único tratamiento permitido durante el transcurso del estudio fue la aplicación de baños emolientes con champú de brea y crema de urea al 5% en excipiente O/W (crema acuosa B.P.) una vez al día.

Protocolo. Previo consentimiento informado de los pacientes, se procedió a su asignación aleatoria a uno de los dos grupos de tratamiento mediante un programa de números aleatorios generado por computador. A la entrada en el protocolo (Semana -3) se efectuó un examen físico, determinación del peso, índice PASI, analítica (bloque Coulter, determinación bioquímica automatizada SMAC 12, estudio de lípidos) y se efectuó la prescripción de la crema de urea al 5% en excipiente O/W. Se proporcionaron instrucciones escritas a los pacientes para que siguieran durante todo el transcurso del estudio una dieta normocalórica baja en lípidos, en especial AA, ácido linoleico y grasas saturadas. La composición porcentual de la dieta era como sigue: hidratos de carbono, 52%, proteínas, 22%, lípidos, 25%, y se excluían de la misma todo tipo de grasas y aceites, la carne roja, la mantequilla y derivados lácteos, la yema de huevo y los frutos secos.

Al cabo de 3 semanas (Semana 0) se efectuó una visita de control, con examen físico y pesaje del paciente, practicándose la determinación del PASI, fotografías clínicas, obtención de muestras de sangre para efectuar determinaciones analíticas (bloque Coulter, determinación bioquímica automatizada SMAC 12, estudio de lípidos, metabolismo del AA endógeno en PMN y plaquetas) y obtención de una biopsia cutánea mediante punch de 4 mm en el borde de una placa activa, previa anestesia tópica con Scandicafina al 1%. En este momento se iniciaba la administración del tratamiento a doble ciego, correspondiente a aceite de pescado o aceite de oliva, según el grupo al que había sido asignado inicialmente el paciente.

Se efectuó una visita de control a las 4 semanas de tratamiento (Semana 4), efectuándose una determinación del PASI y registrando cualquier posible efecto adverso.

A las 8 semanas de tratamiento (Semana 8) se efectuó una visita de control, con examen físico y pesaje del paciente, practicándose la

determinación del PASI, fotografías clínicas, obtención de muestras de sangre para efectuar determinaciones analíticas (bloque Coulter, determinación bioquímica automatizada SMAC 12, estudio de lípidos, metabolismo del AA endógeno en PMN y plaquetas) y obtención de una biopsia cutánea mediante punch de 4 mm en el borde de la misma placa biopsiada originalmente o de una lesión simétrica, previa anestesia tópica con Scandicaina al 1%. En esta visita se dio por finalizado el período de estudio para cada paciente, suspendiendo el tratamiento dietético, la administración de cápsulas e instaurándose en su caso tratamiento apropiado a la extensión y gravedad de la psoriasis del paciente.

Tratamiento. Se emplearon cápsulas translúcidas de color amarillo, proporcionadas gentilmente por el Sr. C. Pelejero, de Puig S.A., que contenían 1 g de aceite de pescado, compuesto en un 21,56% de EPA, un 4,56% de DHA y conteniendo 15 mg de α -Tocoferol, como antioxidante, o 1 g de aceite de oliva, conteniendo 78,27% de ácido oleico, 10,60% de ácido palmítico y 6,60% de ácido linoleico, según el resultado de su análisis mediante cromatografía de gases.

Las cápsulas se administraron en número de 12 al día, distribuidas en 3 a 4 tomas coincidiendo con las comidas. Los pacientes asignados al grupo de tratamiento con aceite de pescado recibieron por consiguiente una dosis diaria de 2,59 g de EPA y 0,55 g de DHA. Las cápsulas se suministraron previo recuento en cada visita, sirviendo como control del cumplimiento el recuento del número de cápsulas que aportaban sin consumir los pacientes.

Evaluación clínica. La evaluación clínica de la respuesta de la psoriasis al tratamiento se efectuó mediante el Psoriasis Area and Severity Index (PASI) [453], que evalúa el grado de eritema, infiltración, descamación y extensión de las lesiones, y permite asignar una puntuación comprendida entre 0 (ausencia de lesiones) y 72 (eritrodermia psoriásica de la mayor intensidad posible), a

intervalos de 0.1.

Para calcular el PASI (Psoriasis Area Severity Index) se evalúan cuatro áreas principales del cuerpo: cabeza (c), tronco (t), extremidades superiores (s) y extremidades inferiores (i), que corresponden respectivamente al 10, 20, 30 y 40% de la superficie corporal total. Se atribuye un valor numérico (0 = ausencia de afectación, 1 = <10%, 2 = 10<30%, 3 = 30<50%, 4 = 50<70%, 5 = 70<90%, y 6 = 90-100%) al porcentaje de la superficie afectada por la psoriasis en cada una de estas cuatro áreas principales (A_c , A_t , A_s , A_i). A fin de evaluar la intensidad de los signos de afectación en las lesiones psoriásicas se evalúan tres síntomas: a saber el eritema (E), la infiltración (I) y la descamación (D) según una escala comprendida entre 0 (ausencia de afectación cutánea) y 4 (máxima intensidad posible).

Para calcular el PASI se multiplican la suma de las puntuaciones de intensidad para los tres parámetros por el valor numérico de la superficie afectada y por el porcentaje correspondiente a la superficie corporal total, sumándose los resultados para obtener el PASI. Esta fórmula se puede expresar como sigue:

$$\text{PASI} = 0.1 (E_c + I_c + D_c) A_c + 0.3 (E_t + I_t + D_t) A_t + \\ 0.2 (E_s + I_s + D_s) A_s + 0.4 (E_i + I_i + D_i) A_i$$

El PASI varía de modo discontinuo a intervalos de 0.1 unidades entre 0.0 (ausencia de lesiones) y 72.0 (eritrodermia psoriásica de la máxima intensidad posible).

El cálculo del PASI para cada paciente se efectuó en condiciones similares en cada visita, y los valores se registraron en una hoja de seguimiento protocolizada. Al principio del estudio, el PASI debía estar comprendido entre 10 y 50 en todos los pacientes, y se efectuaron valoraciones al inicio del estudio y de la dieta (semana

-3), así como a las semanas 0 (inicio de la administración de cápsulas de aceite de pescado o de oliva), 4 y 8 (final) del estudio. A efectos de su valoración estadística se tuvieron en cuenta asimismo la suma de las puntuaciones correspondientes al grado de eritema, infiltración y descamación en cada evaluación, y la mejoría relativa en el PASI, que se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{DiffPASI}_n \text{ (porcentaje de mejoría relativa)} = 100 \times (\text{PASI Semana 0} - \text{PASI}_n) / \text{PASI Semana 0}$$

Evaluación histológica. Se practicaron biopsias cutáneas mediante punch de 4 mm, previa anestesia local con Seandicaína al 2%, al principio y final de la administración de las cápsulas, en el borde de una determinada placa de psoriasis o en áreas equivalentes. La evaluación de la respuesta histológica se efectuó registrando el promedio de tres determinaciones del espesor, expresado en μm , de a) la capa córnea, b) la placa suprapapilar, entre la porción más superior de las papilas dérmicas y la capa granulosa, y c) el grado de acantosis epidérmica, midiendo la distancia entre la porción más inferior de las crestas interpapilares y la capa granulosa, siempre en dirección perpendicular a la superficie cutánea, en secciones transversas de bloques de parafina teñidas mediante hematoxilina-eosina, empleando un ocular micrométrico, a un aumento de 100x o 400x.

Evaluación bioquímica. Los controles analíticos practicados incluyeron un bloque de recuentos Coulter, recuento diferencial de leucocitos, VSG, electrolitos séricos, glucemia, creatinina, urea, enzimas hepáticas, colesterol, triglicéridos y un estudio de lípidos. Las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas, se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugaron a 1500 g durante 20 minutos a 4°C y se mantuvieron a 4°C hasta que fueron procesadas. Se empleó una alícuota para determinar los

niveles de colesterol total, triglicéridos y apolipoproteína A1 (Apo A1) y Apo B, empleándose el resto de la muestra para efectuar las determinaciones de apolipoproteínas, colesterol en cada una de las fracciones de lipoproteínas y colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas totales en cada una de las diferentes fracciones de Apo E, según la metodología descrita previamente [454].

Evaluación del efecto del tratamiento sobre el metabolismo del AA endógeno en suspensiones de PMN. Se procedió a la obtención de suspensiones de PMN, en las semanas -3, 0 y 8 del estudio (inicio de la dieta, inicio y final del período de tratamiento, respectivamente), según el método descrito en 4.1.3. Se preincubaron por quintuplicado alícuotas de 0.5 mL de suspensiones de PMN durante 5 minutos a 37°C, añadiéndose posteriormente 2.5 µL de una solución etanólica de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 5 µM), con el objeto de activar la 5-lipoxigenasa. La reacción se paró 30 segundos o 5 minutos después con 0.5 mL de metanol frío (0°C) y las muestras se mantuvieron en baño de hielo-agua, hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo anteriormente mencionado en la sección 4.2. y los métodos de desarrollo cromatográfico T1 y T2.1, efectuándose la detección de los picos mediante una célula de espectrofotometría UV-Vis, valorándose la absorción a 280 nm (leucotrienos) y 234 nm (monohidroxiderivados).

Evaluación del efecto del tratamiento sobre el metabolismo del AA endógeno en suspensiones de plaquetas. Se procedió a la obtención de suspensiones de plaquetas en las semanas -3, 0 y 8 del estudio (inicio de la dieta, inicio y final del período de tratamiento, respectivamente), según el método descrito en 4.1.2. Se preincubaron por quintuplicado alícuotas de 0.5 mL de suspensión plaquetar durante 5 minutos a 37°C, añadiéndose a continuación 2.5 µL de una

solución etanólica de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 5 μM), para activar el metabolismo del AA endógeno. La reacción se paró 10 segundos o 5 minutos después con 0.5 ml. de metanol frío (0°C) y las muestras se mantuvieron en baño de hielo-agua, hasta su centrifugación a 15000 g durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando el equipo anteriormente mencionado en la sección 4.2. y el método de desarrollo cromatográfico T1, efectuándose la detección de los picos mediante una célula de espectrofotometría UV-Vis, valorándose la absorción a 234 nm.

Metodología estadística. Se procedió al análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante la prueba U de Mann-Whitney, para la comparación de muestras independientes (grupos de tratamiento) y la prueba T de Wilcoxon, para comparación de datos apareados (semanas de tratamiento). El cálculo de los coeficientes de correlación se basó en la confirmación de la hipótesis de normalidad de las muestras mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En todos los casos se aceptaron como significativos los valores de $P < 0.05$.