

Estudio de las poblaciones linfocitarias en las lesiones de psoriasis tras el bloqueo del factor de necrosis tumoral alfa con etanercept

L. Mahiques^a, G. Pitarch^a, J.L. Sánchez-Carazo^a, A. Pérez-Ferriols^a, C.J. Soriano^b y V. Alegre^a

^aServicio de Dermatología. ^bServicio de Cardiología. Hospital General Universitario de Valencia. Valencia. España.

Introducción. La psoriasis es una enfermedad de fuerte base inmune, con un predominio de respuesta inmune celular o Th1. Entre los nuevos fármacos que han demostrado eficacia está el etanercept, un receptor para el factor de necrosis tumoral alfa que bloquea su acción.

Objetivos. Como objetivos nos planteamos en primer lugar determinar la respuesta histológica a etanercept mediante la determinación de las poblaciones linfocitarias en las lesiones psoriásicas; y en segundo lugar, determinar la respuesta clínica al fármaco mediante el *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI) y valorar el efecto de etanercept sobre las poblaciones linfocitarias en sangre.

Métodos. Tratamos 10 pacientes con psoriasis en placas con PASI > 10. Se les realizó una evaluación clínica, un punch de 4 mm en la placa y una determinación de poblaciones linfocitarias en sangre antes del comienzo y tras 12 semanas de tratamiento con etanercept 50 mg/semana.

Resultados. Hubo un descenso significativo en las distintas poblaciones linfocitarias de las lesiones tras el tratamiento con etanercept. Así, los linfocitos T CD4+ antes y después del tratamiento con etanercept registraron los siguientes valores: $16,93 \pm 8,13$ y $6,51 \pm 3,46$ ($p < 0,007$), respectivamente. Y los linfocitos T CD8+ antes y después del tratamiento con etanercept registraron: $17,73 \pm 9,77$ y $10,50 \pm 9,4$ ($p < 0,005$), respectivamente. El PASI mejoró globalmente tras 12 semanas de tratamiento. En un principio el PASI basal mostraba $33,30 \pm 10,71$, y tras el tratamiento se registró $15,20 \pm 13,28$, $p < 0,008$. Nueve de los diez pacientes mejoraron y una paciente se mantuvo sin mejoría. No hubo diferencias significativas en las poblaciones linfocitarias sanguíneas antes y después del tratamiento.

Conclusiones. Etanercept es un fármaco que mejora clínicamente la psoriasis y disminuye la infiltración inflamatoria de las lesiones sin afectar a las poblaciones linfocitarias sanguíneas.

Palabras clave: psoriasis, linfocitos, tratamiento.

ANALYSIS OF LYMPHOCYTE POPULATIONS IN PSORIATIC PLAQUES FOLLOWING INHIBITION OF TUMOR NECROSIS FACTOR α WITH ETANERCEPT

Abstract. Introduction. Psoriasis is a disease with a strong immunological component in which there is a predominant T helper 1 cell-mediated immune response. Etanercept, a receptor for tumor necrosis factor α that blocks its action, is a new drug with proven efficacy in the treatment of psoriasis.

Objectives: The primary objective of this study was to assess the histological response to etanercept by analyzing the lymphocyte populations in psoriatic plaques. The secondary objectives were to assess the clinical response to the drug using the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) and to analyze the effect of etanercept on peripheral blood lymphocyte populations.

Methods. Ten patients with plaque psoriasis and a PASI score greater than 10 were included in the study. A clinical assessment was performed in all patients along with a 4-mm skin punch biopsy of a plaque and

Correspondencia:
Laura Mahiques Santos.
Servicio de Dermatología.
Hospital General Universitario de Valencia.
Avda. Tres Cruces, s/n. 46014 Valencia. España.
laura_mahiques@aedv.es

Aceptado el 9 de mayo de 2007.

analysis of peripheral blood lymphocyte populations at baseline and after 12 weeks of etanercept therapy at a dose of 50 mg per week.

Results. There was a significant reduction in different lymphocyte populations in the plaques following treatment with etanercept. The mean (SD) number of CD4⁺ T lymphocytes per microscopic field decreased from 16.93 (8.13) at baseline to 6.51 (3.46) after treatment with etanercept ($P < 007$). CD8⁺ T lymphocytes also decreased from 17.73 (9.77) before treatment to 10.50 (9.4) after treatment ($P < 005$). An overall improvement in PASI score was also observed: 33.30 (10.71) at baseline versus 15.20 (13.28) following treatment ($P < 008$). Nine out of 10 patients showed improvement.

No significant differences were observed in peripheral blood lymphocyte populations before and after treatment.

Conclusions. Etanercept leads to clinical improvement of psoriasis and reduces inflammatory infiltration of the lesions without affecting peripheral blood lymphocyte populations.

Key words: psoriasis, lymphocytes, treatment.

Introducción

La psoriasis es una enfermedad crónica que afecta a un 2-3 % de la población mundial¹. Hasta los años ochenta se consideraba un trastorno primario del queratinocito, en el que una alteración en la diferenciación del mismo llevaba a una hiperproliferación de los queratinocitos^{2,3}. Hoy en día se considera uno de los trastornos autoinmunes mediados por linfocitos T más comunes⁴. Se ha caracterizado el infiltrado de linfocitos en la placa psoriásica y se ha encontrado un predominio de linfocitos T CD4⁺ en dermis y de linfocitos T CD8⁺ en epidermis^{5,6}. Diversos estudios han mostrado la importancia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el desarrollo y mantenimiento de las lesiones de psoriasis^{7,8}.

Etanercept (Enbrel[®], Wyeth) es un fármaco modificador de la enfermedad de naturaleza proteica completamente humano compuesto por la porción extracelular de 75 kD (p75) del receptor natural del TNF- α unido a la región Fc de la inmunoglobulina G1 (IgG1)^{9,10}. Actúa como un inhibidor competitivo del TNF- α mediante su unión a esta citoquina, impidiendo su interacción con sus receptores en la superficie de distintas poblaciones celulares. A diferencia de otros anti-factores de necrosis tumoral (TNF), etanercept no induce la muerte celular mediada por el complemento *in vitro*.

Nosotros diseñamos un estudio para evaluar el efecto del bloqueo del TNF- α sobre los linfocitos T en la psoriasis, evaluando la respuesta de las poblaciones linfocitarias tras la administración del fármaco etanercept en un grupo de pacientes con psoriasis.

Objetivos

El objetivo primario fue determinar la respuesta histológica mediante la determinación de las poblaciones linfocita-

rias (CD4⁺ y CD8⁺) de las lesiones psoriásicas. Los objetivos secundarios fueron determinar la respuesta clínica a etanercept mediante el *Psoriasis Area and Severity Index* (PASI) y valorar el efecto de etanercept sobre las poblaciones linfocitarias (CD4⁺ y CD8⁺) en sangre.

Material y métodos

En este estudio se incluyeron un total de 10 pacientes con psoriasis en placas moderada-severa durante un periodo de seis meses. Los pacientes no habían recibido en las ocho semanas previas ningún tratamiento sistémico y dos semanas antes habían abandonado los tratamientos tópicos utilizados. Ninguno de los pacientes había llevado anteriormente ningún tratamiento de los denominados biológicos. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de la administración del tratamiento y antes de la realización de las biopsias.

Se determinó el índice de masa corporal (IMC) en todos los pacientes antes del comienzo del tratamiento.

El estudio fue aprobado por el comité ético de la institución.

Los pacientes recibieron etanercept (Enbrel[®], Wyeth) en monoterapia a dosis de 25 mg dos veces a la semana durante 12 semanas.

La afectación clínica de la enfermedad fue determinada mediante el PASI. Este índice se cuantificó antes de la administración inicial de etanercept y tras doce semanas de tratamiento.

En cada paciente se realizó una biopsia de una placa representativa de su enfermedad mediante un punch de 4 mm antes del comienzo del tratamiento y tras 12 semanas de medicación.

Como anestesia se usó mepivacaína sin vasoconstrictor, y para el cierre de la zona se usó sutura con monofilamento no reabsorbible.

Las biopsias procedentes de las lesiones en placa fueron incluidas en formalina 10% tamponada (*WWR International*). Tras la confirmación del diagnóstico de psoriasis mediante tinción con hematoxilina-eosina, se procedió a realizar tinción inmunohistoquímica mediante *Bond Polymer Detection System* (*Vision BioSystems*, Australia) para la identificación de los linfocitos T CD4+ (*Novocastra Laboratories*, Newcastle, Reino Unido) y CD8+ (*Novocastra Laboratories*, Newcastle, Reino Unido).

La cuantificación de las distintas poblaciones linfocitarias de CD4 y CD8 fue hecha a 400× de magnificación (aumento). Se cuantificaron todas las células marcadas por campo en la epidermis desde la membrana basal hasta el estrato córneo y en la dermis hasta una profundidad de 600 micras a lo largo de toda la pieza (4 mm). Posteriormente se hizo la media de células por campo. La cuantificación de células en cada biopsia se expresó en número de células positivas por campo de 400×.

Las poblaciones linfocitarias se determinaron mediante recuento automático y se expresaron en número de células por microlitro.

Análisis estadístico

La distribución de las variables continuas se hizo mediante la media \pm DE, mientras que la distribución de las variables categóricas se expresó en frecuencias. Las comparaciones entre las variables continuas antes y después del tratamiento con etanercept se hicieron con la prueba de Wilcoxon para variables relacionadas. La correlación entre las poblaciones de linfocitos T y el PASI tras el tratamiento con etanercept, así como la correlación entre el IMC y el PASI tras el tratamiento con etanercept, fue establecida mediante el cálculo del coeficiente r de Spearman. Se utilizó un nivel bilateral de $p < 0,05$ para determinar la significación estadística. Todo el análisis estadístico se realizó con el SPSS para Windows, versión 11 (SPSS inc, Chicago, Illinois).

Resultados

Pacientes

Participaron en el estudio 10 pacientes con edades comprendidas entre 30 y 56 años (media $48,44 \pm 12,02$ años); seis (60%) eran mujeres y cuatro (40%) eran hombres. El IMC de los participantes en el estudio estuvo comprendido entre $20,96$ y $36,52$ kg/m² (media $20,87 \pm 5,39$ kg/m²).

Dermatopatología

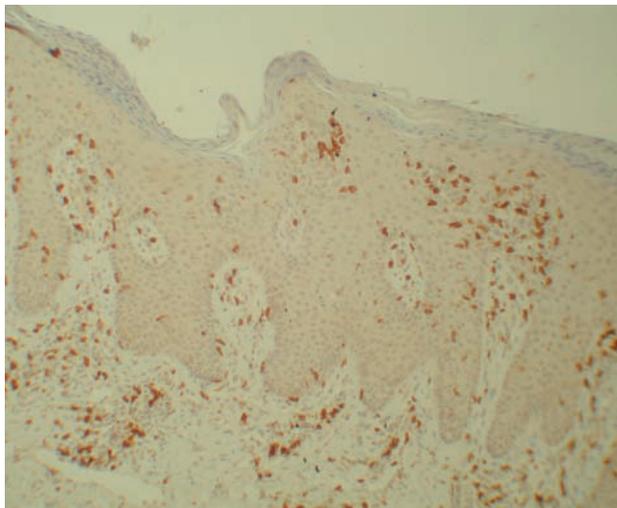
Se analizó un total de 20 biopsias procedentes de 10 pacientes. La cuantificación de las poblaciones linfocitarias totales, en el estrato dérmico y en el estrato epidérmico, se muestran en la tabla 1. Hubo un descenso significativo en las distintas poblaciones linfocitarias tras el tratamiento con etanercept. Los linfocitos CD4 totales basales y tras tratamiento con etanercept mostraron $16,93 \pm 8,13$ frente a $6,51 \pm 3,46$, $p < 0,007$; y los linfocitos CD8 totales basales y tras tratamiento (figs. 1 y 2) con etanercept: $17,73 \pm 9,77$ frente a $10,50 \pm 9,46$, $p < 0,005$. Los linfocitos CD4 basales en dermis y tras tratamiento con etanercept registraron $14,46 \pm 6,42$ frente a $6,11 \pm 3,41$, $p < 0,007$; y los linfocitos CD8 basales en dermis y tras tratamiento con etanercept: $17,29 \pm 7,17$ frente a $11,57 \pm 6,50$, $p < 0,005$. Los linfocitos CD4 basales en epidermis y tras tratamiento con etanercept registraron $2,47 \pm 2,18$ frente a $0,40 \pm 0,29$, $p < 0,008$; y los linfocitos CD8 basales en epidermis y tras tratamiento con etanercept: $17,73 \pm 9,77$ frente a $10,50 \pm 9,46$, $p < 0,005$.

Además encontramos una diferencia significativa en la ratio linfocitos CD4/CD8 en dermis: $0,94 \pm 0,27$ frente a $0,62 \pm 0,36$, $p < 0,47$.

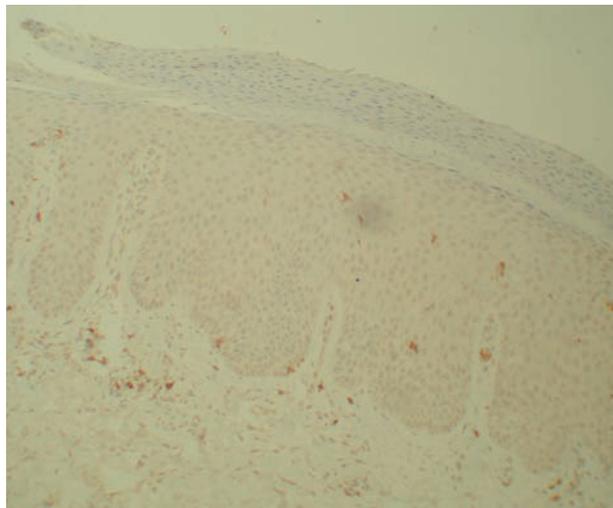
Clínica

El PASI mejoró globalmente tras 12 semanas de tratamiento. El PASI basal mostró $33,30 \pm 10,71$ y tras el

Tabla 1. Poblaciones linfocitarias en piel, dermis y epidermis



Linfocitos CD8 antes del tratamiento (Bond Polymer Detection System 200x).



Linfocitos CD8 tras tratamiento (Bond Polymer Detection System 200x).

tratamiento $15,20 \pm 13,28$, $p < 0,008$. Nueve de los diez pacientes mejoraron y una paciente se mantuvo sin mejoría.

No hubo correlación significativa entre la variación de los linfocitos CD4 totales en la lesión y la mejoría en el PASI ($\rho = -0,49$, $p = 0,15$) ni entre los valores de linfocitos CD8 totales en la lesión y la mejoría en el PASI ($\rho = 0,21$, $p = 0,55$).

Tampoco hubo correlación entre el IMC y la variación del PASI ($\rho = -0,30$, $p = 0,93$).

Sangre

Se analizó un total de 20 muestras de sangre procedentes de los 10 pacientes. No hubo diferencias significativas en las poblaciones linfocitarias sanguíneas antes y después del tratamiento. La media de linfocitos CD4 basales fue de $1.204,40 \pm 869,59$ y tras tratamiento con etanercept fue de $1.021,67 \pm 409,63$, $p < 0,441$. La media de linfocitos CD8 basales fue de $642,50 \pm 351,52$ frente a $583,11 \pm 182,69$ tras etanercept ($p < 0,55$).

Nueve (90%) de los pacientes tuvieron una determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) y ENA negativos antes y después del tratamiento con etanercept. Una (10%) paciente presentó ANA positivos con un título de 1/640 y ENA negativos antes del tratamiento. Tras el tratamiento, el título de ANA aumentó a 1/1.280, se hicieron positivos los anticuerpos contra ribonucleoproteína y sufrió un brote de poliartritis en manos y muñecas. El cuadro clínico y la elevación de autoanticuerpos se resolvieron añadiendo metotrexate 25 mg/semana y prolongando la administración de etanercept.

Acontecimientos adversos

Uno de los pacientes experimentó un impétigo estafilocócico en fosas nasales que tuvo que ser tratado con tratamiento sistémico sin complicaciones. Una paciente presentó reacción local en el sitio de inyección con fenómeno de *recall* que se controló con esteroides locales.

Discusión

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que puede presentarse asociada a artropatía. En la etiología se han implicado distintos genes que interactúan entre sí y con estímulos medioambientales, desencadenando el fenotipo de la enfermedad^{11,12}. En las lesiones de psoriasis se produce una hiperproliferación y una maduración anormal del queratinocito acompañada de un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos T con predominancia de células CD4+ en dermis y CD8+ en epidermis¹³. Se ha visto que la activación local de estas células es crucial en el desarrollo y mantenimiento de las lesiones de psoriasis^{4,14}.

El etanercept es una proteína de fusión compuesta por dos subunidades del receptor p75 del TNF- α que actúa uniéndose de forma competitiva a esta molécula y previene la interacción con sus receptores en las membranas celulares. Etanercept ha mostrado eficacia en el tratamiento de la psoriasis y de la artropatía psoriásica mejorando la afectación clínica^{8,15} y el infiltrado inflamatorio de las lesiones. Nosotros consideramos que etanercept era el agente ideal para estudiar el efecto inmune del bloqueo del TNF de las placas de psoriasis porque su acción es debida a la

neutralización del TNF y no a la depleción de las células que expresan TNF en su superficie.

En nuestro estudio encontramos un descenso precoz del número global de linfocitos T en las lesiones de psoriasis tras 12 semanas de tratamiento en monoterapia con etanercept, lo que concuerda con los resultados de Gottlieb et al¹⁶ tras 24 semanas de tratamiento. Este descenso se produjo tanto en los linfocitos CD4+ como en los linfocitos CD8+ en dermis y epidermis, pero no en sus respectivas poblaciones sanguíneas. El descenso de linfocitos T en las lesiones tras el uso de anti-TNF también se ha constatado en modelos animales y sugiere que la proliferación local de células T en la psoriasis es dependiente de la producción local de TNF- α ⁴. El descenso de la ratio CD4+/CD8+ en dermis tras el tratamiento está de acuerdo con los estudios que sugieren que los linfocitos CD4+, pero no los CD8+, son capaces de desencadenar la lesión de psoriasis, indicando una resolución de las mismas¹⁷.

Realizamos la detección de los autoanticuerpos en busca de posibles elevaciones de estos con el tratamiento y solamente se produjo elevación de los mismos en una paciente que ya tenía ANA positivos previamente, lo que hace pensar que su elevación se produce en individuos predisuestos.

La mejoría clínica experimentada en 9 de nuestros pacientes coincide con lo descrito en la literatura¹⁸. La ausencia de mejoría en uno de nuestros pacientes coincidió con la presencia previa de ANA que aumentó tras el tratamiento con etanercept. En este paciente no se desarrollaron clínica ni histología cutánea de lupus, como demostró la inmunofluorescencia directa negativa. Sí que presentó un episodio agudo de poliartritis que afectó a manos y muñecas, lo que ha sido descrito en algunos pacientes con artritis reumatoide que desarrollaron lupus tras el tratamiento con terapias anti-TNF¹⁹. Tras las 12 semanas iniciales de tratamiento del protocolo se le administró metotrexate 25 mg/semana junto con etanercept, lo que produjo una mejoría de sus lesiones junto con un descenso del título de anticuerpos. En nuestra opinión, el cuadro de esta paciente se correspondería con un brote de artropatía psoriásica acompañando a la refractariedad al tratamiento y no sería un episodio de lupus, ya que mejoró sin necesidad de la suspensión del tratamiento.

No encontramos correlación significativa entre el descenso de linfocitos y la mejoría en el PASI, lo que podría ser explicado por el relativamente corto periodo de tiempo transcurrido entre las biopsias y por el escaso tamaño muestral. También ha sido sugerido que esta escasa correlación es debida a que los linfocitos T actúan de forma local en la producción de las lesiones de psoriasis y que la célula que tiene mayor relevancia en su desarrollo sería la célula dendrítica, que los activaría⁴. Diversos estudios han mostrado que el mantenimiento de etanercept más allá de las 12 semanas iniciales de tratamiento produce una

mejoría clínica en la psoriasis, incluso en aquellos pacientes que no han respondido durante ese periodo inicial^{18,20}. Nosotros no podemos descartar que en un estudio a largo plazo haya una correlación significativa entre el descenso en el PASI y el descenso de linfocitos T en las lesiones.

La ausencia de disminución de poblaciones linfocitarias en sangre se explica por la ausencia de modificación de los niveles sanguíneos de TNF en las fases iniciales del tratamiento con anti-TNF²¹, la menor presencia de TNF en esta que en las lesiones²² y porque etanercept no produce lisis de las células que expresan TNF en su superficie⁹.

Los efectos secundarios durante el tratamiento fueron leves y bien tolerados.

Conclusión

Etanercept produce mejoría clínica y una disminución significativa de los linfocitos CD8 en epidermis y de los linfocitos CD4 en dermis en la placa de psoriasis de forma precoz tras 12 semanas de tratamiento sin producir afectación de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica. Este estudio muestra eficacia y un buen perfil de seguridad de este fármaco en el tratamiento de la psoriasis, pero hacen falta estudios a largo plazo con él.

Conflicto de intereses

Los autores no presentan ningún conflicto de intereses. El estudio no ha sido financiado por ninguna entidad.

Bibliografía

1. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2004;113:1664-75.
2. Lowes MA, Lew W, Krueger JG. Current concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin.* 2004;22:349-69.
3. Gottlieb AB. Psoriasis. Immunopathology and immunomodulation. *Dermatol Clin.* 2001;19:649-57.
4. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and Tumor necrosis Factor α . *J Exp Med.* 2004;199:731-6.
5. Austin LM, Coven TR, Bhardwaj N, Steinmann R, Krueger JG. Intraepidermal lymphocytes in psoriatic lesions are activated GMP-17(TIA-1) + CD8 + CD3 + CTLs as determined by phenotypic analysis. *J Cutan Pathol.* 1998;25:79-88.
6. Ferenczi K, Burack L, Pope M, Krueger JG, Austin LM. CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry. *J Autoimmun.* 2000;14:63-78.
7. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet.* 2001;357:1842-7.

8. Mease P, Goffe B, Metz J, Van der Stoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:385-90.
9. Magliocco MA, Gottlieb AB. Etanercept therapy for patients with psoriatic arthritis and concurrent hepatitis C virus infection: Report of 3 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51:580-4.
10. Estebanz JL. Etanercept. Estructura química, farmacocinética y mecanismo de acción. *Actas Dermosifiliogr*. 2005;96 Supl 3:2-9.
11. Toby AM, Kirby B. TNF- α inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biodrugs*. 2005;19:47-57.
12. Capon F, Trembath RC, Barker JN. An update on the genetics of psoriasis. *Dermatol Clin*. 2004;22:339-47.
13. Mehlis S, Gordon KB. From laboratory to clinic: rationale for biologic therapy. *Dermatol Clin*. 2004;22:371-7.
14. Nickoloff BJ, Kunkel SL, Burdick M, Strieter RM. Severe combined immunodeficiency mouse and human psoriatic skin chimeras: validation of a new animal model. *Am J Pathol*. 1995;146:580-8.
15. Gottlieb AB, Matheson RT, Lowe N, Krueger GG, Kang S, Goffe BS, et al. A randomized trial of etanercept as monotherapy for psoriasis. *Arch Dermatol*. 2003;139:1627-32.
16. Gottlieb AB, Chamian F, Masud S, Cardinale I, Abello MV, Lowes MA, et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol*. 2005;175:2721-9.
17. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 1999;155: 145-58.
18. Leonardi CL, Powers JL, Matheson RT, Goffe BS, Zitnik R, Wang A, et al. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *N Engl J Med*. 2003;349:2014-22.
19. Debandt M, Vittecoq O, Descamps V, Le Loet X, Meyer O. Anti-TNF-alpha-induced systemic lupus syndrome. *Clin Rheumatol*. 2003;22:56-61.
20. Krueger GG, Elewski B, Papp K, Wang A, Zitnik R, Jahreis A. Patients with psoriasis respond to continuous open-label etanercept treatment after initial incomplete response in a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2006;543 Suppl 2:S112-9.
21. Mastroianni A, Minutilli E, Mussi A, Bordinon V, Trento E, D'Agosto G, et al. Cytokine profiles during infliximab-monotherapy in psoriatic arthritis. *Br J Dermatol*. 2005;153: 531-6.
22. Tigalnova M, Bjerke JR, Gallati H, Degré M, Jablonska S, Majewski S, et al. Serum levels of interferons and TNF-alpha are not correlated to psoriasis activity and therapy. *Acta Derm Venereol Suppl (Stochk)*. 1994;186: 25-7.