



VNIVERSITAT  
D<sup>E</sup> VALÈNCIA

**FACULTAT DE FARMÀCIA**  
**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

# **Nuevas perspectivas en el abordaje terapéutico de la psoriasis**

**Tesis Doctoral**

presentada por:

**Jorge Arasa Aparici**

**Valencia, 2014**





**FACULTAT DE FARMÀCIA**  
**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

**M. Carmen Montesinos Mezquita y M. Carmen Terencio Silvestre**, Profesoras Titulares de la Universitat de València.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por el Licenciado **Jorge Arasa Aparici**, titulado “**Nuevas perspectivas en el abordaje terapéutico de la psoriasis**”, ha sido realizado en el Departament de Farmacologia de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Valencia, 2014.

M. Carmen Montesinos Mezquita

M. Carmen Terencio Silvestre





**FACULTAT DE FARMÀCIA**  
**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos y ayudas:

Proyecto SAF209-10347 concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad-Fondo Europeo de desarrollo Regional:

*"Mecanismos implicados en la protección y regeneración tisular en afecciones cutáneas con componente inflamatorio"*

Programa PROMETEO/2010/047 para grupos de investigación de excelencia, concedido por la Generalitat Valenciana:

*"Mecanismos reguladores en procesos inflamatorios"*

Proyecto RETICEF RD07/0013/2001 concedido por el Instituto de Salud Carlos III:

*"Red de investigación en envejecimiento y fragilidad"*



*A papá y mamá,  
por permitirme seguir soñando*

*A Jaime,  
porque ni en los mejores sueños existe un hermano como tú*



*Esta Tesis no hubiera podido realizarse sin esas personas que te apadrinan, te miman y te guían durante estos años. Por ello, quiero expresar mi más sincero agradecimiento...*

*...A les meus directores de Tesi, Monte i Terens, per creure en mi des del principi i estar al meu costat ensenyant-me i contagiant-me la vostra il·lusió durant esta aventura.*

*...A los profesores del departamento, por hacerme sentir como en casa. A Isabel y Marisa por su cercanía, sus sabios consejos y su disponibilidad inmediata.*

*...A la Dr. Valcuende y Dr. Navalón, responsables de la obtención de muestras.*

*...A todo el personal de secretaría, por su inestimable ayuda durante todos estos años.*

*...A todos los evaluadores y miembros del tribunal, por su tiempo y dedicación en la valoración de la presente Tesis Doctoral.*

...A los compañeros del laboratorio y amigos con los que he compartido una parte o la totalidad de estos años. Por todas las "blancas palomas", las risas de pájaro loco, los "guaranás", las cenas "destroyer", los "qué horror", las conversaciones improductivas, (...), los intentos fallidos de cinefórum, los "ni de coña", los spoilers, los "seeh"... en definitiva, por convertir estos años de doctorado en un sinfín de anécdotas para (no) contar a nuestros nietos.

...A mi familia, por vuestro amor incondicional y vuestra fuerza en los momentos difíciles. Porque sin vosotros, nada de esto tendría sentido.

## ABREVIATURAS

---

AC	Adenilato ciclasa
ADA	Adenosina deaminasa
AdK	Adenosin kinase: adenosina cinasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosin bifosfato
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	AMP cíclico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
APC	Antigen-presenting cells: células presentadoras de antígenos
AP-1	Activator proteín 1: Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATF	Activating transform factor: factor de transcripción activador
ATP	Adenosin trifosfato
bFGF	Basic fibroblast growth factor: factor básico de crecimiento de fibroblastos
CAF	Cancer associated fibroblasts: fibroblastos asociados al cáncer
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand: quimiocina (C-C) ligando
CK	Cytokeratin: citoqueratina
COX	Ciclooxigenasa
CREB	cAMP response element-binding proteína: proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc
CXCL-1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1: quimiocina (C-X-C) ligando 1
DC	Dendritic cell: Célula dendrítica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DX	Dexametasona
ENT	Equilibrative nucleoside transporter: transportador equilibrativo de nucleósidos

ERK	Extracellular signal-regulated kinases: cinasas reguladas por señales extracelulares
FADH	Flavín adenenín dinucleótido
GWAS	Genome-wide association study: estudio de asociación del genoma completo
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid: ácido hidroxieicosatetraenoico
IECA	Inhibidor de la enzima inhibidora de angiotensina
IFN	Interferón
IL	Interleucina
Jak	Janus kinase: Janus cinasa
JNK	c-Jun N-terminal kinase: c-Jun N-terminal cinasa
LC	Langerhans cell: célula de Langerhans
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MAPK	Mitogen-activated proteína kinase: proteínas cinasas activadas por mitógeno
MCP	Monocyte chemotactic protein: proteína quimioatrayente de monocitos
mDC	Myeloid dendritic cell: célula dendrítica mielóide
MHC	Major histocompatibility complex: Complejo mayor de histocompatibilidad
mTOR	Mammalian target of rapamycin: diana de rapamicina en células de mamífero
MTX	Metotrexato
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEMO	NF-κB essential modulator: modulador esencial de NF-κB
NF-κB	Nuclear factor κB: Factor de transcripción nuclear κB
NK	Células natural killer
PASI	Psoriasis Area Severity Index: índice de intensidad y gravedad de la psoriasis

PBMC	Peripheral blood mononuclear cell: células mononucleares de sangre periférica
PDE	Phosphodiesterase: fosfodiesterasa
pDC	Plasmacytoid dendritic cell: célula plasmocitoide dendrítica
PG	Prostaglandina
PGES	Prostaglandina E sintasa
PI3k	Phosphoinositide 3-kinase: fosfoinositol 3-cinasa
mPGES	PGES de origen microsomal
PK	Protein kinase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> : Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PSORS	Regiones de susceptibilidad genética para la psoriasis
Ser	Serina
TGFβ	Transforming growth factor β: factor de crecimiento transformante β
Thr	Threonine: Treonina
TLR	Toll-like receptor: receptor Toll-like
TNFα	Tumor necrosis factor α: Factor de necrosis tumoral α
TNFR	Receptor de TNFα
TPA	12-O-Tetradecanoillforbol-13-acetato
Tyr	Tyrosine: Tirosina
TX	Tromboxano
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor: Factor de crecimiento endotelial vascular



<b>RESUMEN</b>	19
<b>INTRODUCCIÓN</b>	25
<b>1. La Piel</b>	27
1.1. Epidermis	28
1.2. Dermis	29
<b>2. Psoriasis</b>	31
2.1. Fenotipo y características histopatológicas	33
2.2. Etiología	34
2.2.1. Factores genéticos	35
2.2.2. Factores ambientales	35
2.3. Inmunopatogénesis	39
2.3.1. Tipos celulares en psoriasis	39
2.3.2. Mediadores inflamatorios	43
2.3.3. Inicio de la enfermedad	48
2.3.4. Vías de señalización	50
2.4. Farmacoterapia	57
<b>3. Adenosina</b>	60
3.1. Receptores de adenosina	60
3.2. Adenosina extracelular y metabolismo	62
3.3. Adenosina en inflamación	63
<b>OBJETIVOS</b>	65
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	69
<b>1. In vivo: Modelo de hiperplasia en piel de ratón</b>	71
1.1. Animales de experimentación	71
1.2. Molécula en estudio	71
1.3. Protocolo experimental	72
1.4. Homogenización de las biopsias	73
1.5. Determinación de parámetros inflamatorios	73
1.5.1. Actividad mieloperoxidasa	73

1.5.2. Determinación de LTB <sub>4</sub> mediante radioinmunoensayo	74
1.5.3. Determinación de CXCL-1 y TNF $\alpha$ por ELISA	76
1.5.4. Determinación de la subunidad p65 fosforilada del complejo NF- $\kappa$ B mediante Western Blot	77
1.5.5. Procedimiento histológico	78
<b>2. In vitro: Ensayos en fibroblastos sanos y psoriásicos</b>	81
2.1. Aislamiento y cultivo de fibroblastos	81
2.2. Estímulos, productos y condiciones de experimentación	85
2.3. Expresión de vimentina por inmunofluorescencia	86
2.4. Ensayo de viabilidad celular	87
2.5. Determinación de IL-6 e IL-8 por ELISA	88
2.6. Determinación de la producción de PGE2 por radioinmunoanálisis	88
2.7. Detección de la expresión de COX-2 por inmunocitoquímica	89
2.8. Análisis de la expresión de COX-2 y estudio de la señalización celular por Western blot	90
2.9. RT-PCR a tiempo real	91
<b>3. Análisis estadístico y expresión de los resultados</b>	95
<b>RESULTADOS</b>	97
<b>PARTE I: ESTUDIO DEL EFECTO DE CGS-21680 EN EL MODELO DE HIPERPLASIA EN PIEL DE RATÓN INDUCIDA POR TPA</b>	99
<b>1. Estudio del efecto de CGS-21680 en el modelo de hiperplasia en piel de ratón inducida por TPA</b>	99

1.1. Efecto de CGS-21680 sobre la lesión cutánea y el edema inducidos por TPA	101
1.2. Estudio histopatológico del efecto de CGS-21680	103
1.3. Efecto del CGS-21680 sobre la proliferación celular	105
1.4. Efecto de CGS-21680 sobre diversos mediadores quimioatrayentes	107
1.5. Efecto del CGS-21680 sobre la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de TNF $\alpha$	109
<b>PARTE II: MEDIADORES INFLAMATORIOS EN FIBROBLASTOS SANOS Y PSORIÁSICOS</b>	113
<b>2. Mediadores inflamatorios en fibroblastos sanos y psoriásicos</b>	115
2.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de los fibroblastos dérmicos	115
2.1.1. Condiciones de experimentación y estudio preliminar	116
2.1.2. Ensayo de viabilidad celular (MTT)	117
2.1.3. Determinación de IL-8 e IL-6 por ELISA	118
2.1.4. Determinación de la producción de PGE <sub>2</sub> por RIA	120
2.2. Vías de señalización implicadas en el estudio de la liberación de IL-6 e IL-8 en fibroblastos dérmicos sanos y psoriásicos	122
2.2.1. Estudio de tiempo-dependencia de liberación de IL-8 e IL-6	122
2.2.2. Análisis de la activación de NF- $\kappa$ B	123
2.2.3. Análisis de la activación de STAT3	124
2.2.4. Análisis de las vías de señalización de MAPK	127
2.2.5. Confirmación de la MAPK responsable de la fosforilación en el residuo Ser727 de STAT3	131

2.2.6. Generación de IL-8 e IL-6 por ELISA	137
2.3. Estudio de COX-2 en fibroblastos dérmicos sanos y psoriásicos	136
2.3.1. Análisis de la expresión de COX-2 por inmunocitoquímica	136
2.3.2. Análisis de la expresión de COX-2 por Western Blot	137
2.3.3. Análisis de la expresión de COX-2 por RT-PCR a tiempo real	139
2.3.4. Análisis de la expresión de COX-1 por RT-PCR a tiempo real	140
2.3.5. Análisis de la señalización celular responsable de la síntesis de COX-2	141
2.3.5.1. Vía de señalización NF- $\kappa$ B	141
2.3.5.2. Vía de señalización CREB	145
2.3.5.3. Vía de señalización MAPK	146
2.3.6. Análisis de la expresión de COX-2 por RT-PCR a tiempo real en presencia del inhibidor de SAPK/JNK	149
<b>DISCUSIÓN</b>	151
<b>PARTE I: ESTUDIO DEL EFECTO DE CGS-21680 EN EL MODELO DE HIPERPLASIA EN PIEL DE RATÓN INDUCIDA POR TPA</b>	155
<b>PARTE II: MEDIADORES INFLAMATORIOS EN FIBROBLASTOS SANOS Y PSORIÁSICOS</b>	161
<b>CONCLUSIONES</b>	173
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	177
<b>ANEXOS</b>	199
Relación de muestras psoriásicas empleadas	201
Informe del Comité Ético de Investigación Animal	203
Informe del Comité Ético de Investigación en Humanos	204

# RESUMEN

---



En la actualidad las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, como la psoriasis, tienen un impacto significativo en cuanto a la calidad de vida de los pacientes y sus familias, además de representar una carga económica considerable. Se estima que aproximadamente el 3% de la población mundial sufre psoriasis. Esta patología presenta tres componentes característicos: un desequilibrio entre la respuesta inmune local y sus mecanismos reguladores, una respuesta inflamatoria exagerada y una renovación epidérmica incrementada.

A pesar del efecto beneficioso que ha supuesto la introducción de las nuevas aunque costosas terapias biológicas en el tratamiento sistémico de la psoriasis, el metotrexato es un agente inmunosupresor que se utiliza todavía para casos moderados a graves, resultando especialmente útil para tratar las exacerbaciones de la enfermedad frecuentes con el uso de terapias biológicas. Este fármaco, introducido en dermatología en 1951, se sigue considerando un agente de primera línea en el tratamiento oral de la psoriasis a pesar de sus efectos adversos, ya que los muchos años de experiencia en su empleo permiten aprovechar su efecto beneficioso. Sin embargo, su mecanismo de acción sigue siendo cuestión de investigación. En este sentido, diversos estudios indican que el metotrexato promueve la acumulación de adenosina extracelular en lugares de la inflamación, lo cual podría ser una de las razones por la que presente su efecto antiinflamatorio.

La adenosina es un regulador conocido de la inflamación y de la inmunidad, que ejerce sus efectos mediante la interacción con uno o más de sus cuatro receptores de superficie celular ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ). Además, se ha descrito que agonistas de receptores de la adenosina promueven la reparación de heridas cutáneas.

Por tanto, en el primer apartado de la presente Tesis Doctoral, se aborda el estudio del posible efecto antiinflamatorio de CGS-21680 (2-[4-[[2-carboxietil]fenil]etilamino]-5'-N-etilcarboxiamidoadenosina), agonista del receptor  $A_{2A}$  de adenosina, tras su aplicación tópica en el modelo de hiperplasia epidérmica en ratón inducida por la administración de 12-o-

tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), el cual reproduce algunas de las principales características bioquímicas e histopatológicas de la psoriasis.

La aplicación de CGS-21680 a la dosis de 5 µg/sitio en la piel del ratón, no sólo redujo todos los parámetros inflamatorios determinados en este protocolo experimental, sino que también presentó un efecto protector en la dermis, que podría ser potencialmente interesante frente al empleo de corticoesteroides tópicos que causan atrofia de la piel después de su uso continuado. Por tanto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la utilidad potencial que ofrece la activación de receptores  $A_{2A}$  de la adenosina en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel caracterizadas por hiperproliferación epidérmica, tales como la psoriasis.

En el siguiente apartado de la presente tesis doctoral profundizamos en la dermis, concretamente en su célula más abundante en esta capa de la piel, el fibroblasto. Este tipo celular está altamente implicado en el mantenimiento de una adecuada respuesta inmune y en la regulación de la homeostasis tisular. Sin embargo, el papel que juega en el desarrollo de la patología psoriásica no está claramente definido. La mayoría de los estudios se realizan utilizando fibroblastos procedentes de resecciones quirúrgicas de donantes sanos, pero la constante exposición a un microambiente alterado por un proceso patológico crónico, como la psoriasis, podría afectar el comportamiento de este tipo celular.

Los elevados niveles de  $TNF\alpha$  presentes en psoriasis junto con la alta producción de  $IL-1\beta$  por queratinocitos en enfermedades inflamatorias de la piel, así como la capacidad del TPA para reproducir los síntomas histopatológicos característicos de la psoriasis en piel de ratón, han motivado que sean los estímulos empleados en el presente apartado en el que se ha estudiado la liberación de  $IL-8$  e  $IL-6$ , implicadas en la patogénesis de la psoriasis, y la producción de la prostaglandina  $E_2$  y ciclooxigenasa-2, por su controvertida contribución en esta patología.

Nuestros resultados muestran que hay diferencias significativas en la expresión y producción de los distintos parámetros inflamatorios estudiados en fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos que corresponden a una alteración presente en la vía de señalización de SAPK/JNK. Así pues, creemos esencial seguir con el estudio de este tipo celular en psoriasis con el fin de comprender la implicación real del fibroblasto en la patogénesis de esta enfermedad.



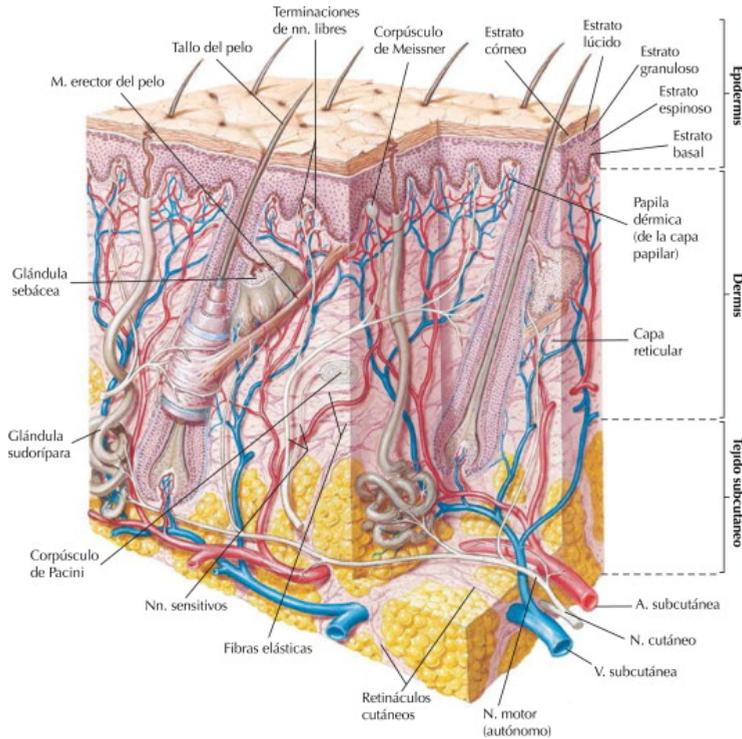
# INTRODUCCIÓN

---



## 1. La Piel

Extensa, singular, protectora, sensorial; el órgano más grande del cuerpo, la piel, nos identifica y define, nos permite interactuar con el medio y nos protege y aísla eficazmente. Con una extensión y espesor medios de 2 m<sup>2</sup> y 2 mm respectivamente, la piel constituye el 16% del peso corporal de un adulto.



**Figura 1.** Corte transversal de piel y tejido subcutáneo (Netter, 2011)

Estructuralmente, desde la parte más externa a la más interna, la piel o membrana cutánea, se divide en dos capas: epidermis y dermis. Existe una tercera capa que no pertenece a la piel pero que sirve de separación entre ésta y otros tejidos y órganos internos denominada hipodermis o tejido subcutáneo. Rica en grasa, la hipodermis es un tejido laxo que cumple funciones de reserva energética, aislamiento térmico y protección física (Figura 1).

### 1.1. Epidermis

La epidermis es la capa más fina y superficial de la piel y está compuesta principalmente por cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel (Figura 2). Las primeras constituyen aproximadamente el 90% de las células epidérmicas y están distribuidas a lo largo de cinco subcapas o estratos denominados estrato germinativo, donde se incluyen los estratos basal y espinoso; estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Figura 1). Los queratinocitos se dividen por mitosis en la capa más interna de la epidermis, el estrato basal, avanzando hacia las capas más externas donde sufrirán procesos apoptóticos, perdiendo así su núcleo y quedando únicamente repletas de queratina y lípidos, que conferirán protección e impermeabilidad a la piel.

Los melanocitos conforman alrededor del 8% de las células epidérmicas y son los encargados de proteger a la piel de los rayos ultravioletas nocivos mediante la producción de un pigmento denominado melanina.

Las células de Langerhans (LC) son células dendríticas especializadas en la presentación de antígenos (CPA), es decir, poseen la capacidad de fagocitar y exteriorizar fragmentos del elemento fagocitado en su membrana a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estas células, junto a los linfocitos, también presentes en la epidermis en condiciones normales, se encargan de dar protección inmunológica a la piel (Tortora y Derrickson, 2006).

Finalmente, las células menos numerosas de la epidermis son las células de Merkel, las cuales se encuentran en contacto con células nerviosas formando unas estructuras denominadas discos táctiles que serán los encargados de discriminar entre diferentes aspectos de las sensaciones táctiles.

## 1.2. Dermis

La dermis, localizada entre la epidermis y la hipodermis, es una capa formada principalmente por tejido conectivo que alberga nervios y terminaciones nerviosas, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, fibras musculares y vasos sanguíneos y linfáticos. Por su estructura tisular, la dermis o *corion* puede dividirse en un estrato de tejido conectivo laxo conocido como región papilar y un estrato más denso denominado región reticular (Figura 1). La primera región toma su nombre de la existencia de pequeñas estructuras digitiformes de forma papilar llamadas papilas dérmicas que se proyectan en la epidermis y que son las responsables de las respuestas táctiles. La región papilar de la dermis se encuentra conectada con el estrato basal de la epidermis formando la unión dermoepidérmica caracterizada por la presencia de una membrana basal que contiene elementos fibrosos especializados y un gel polisacárido único que, junto con la membrana basal, sirve como cemento de unión. Esta zona de contacto actúa además como barrera parcial para el paso de algunas células y grandes moléculas.

La capa más gruesa de la dermis es la denominada región reticular y está constituida mayoritariamente por un entramado de fibras de colágeno y elastina que confieren resistencia, extensibilidad y flexibilidad a la piel. También existen proteoglicanos estructurales que proporcionan viscosidad e hidratación. Éstos, junto con otros componentes no estructurales, forman la matriz extracelular (ECM) y son producidos principalmente por las células predominantes residentes en la dermis, los fibroblastos.

Otros tipos celulares presentes en la dermis en condiciones fisiológicas son los mastocitos, macrófagos, células dendríticas y células T, implicadas en la respuesta inmunológica (Figura 2). Es importante mencionar que en condiciones normales existe también una migración continua de leucocitos desde los vasos sanguíneos hacia la membrana cutánea (Latarjet y cols., 2004; Tortora y Derrickson, 2006; Netter, 2011).

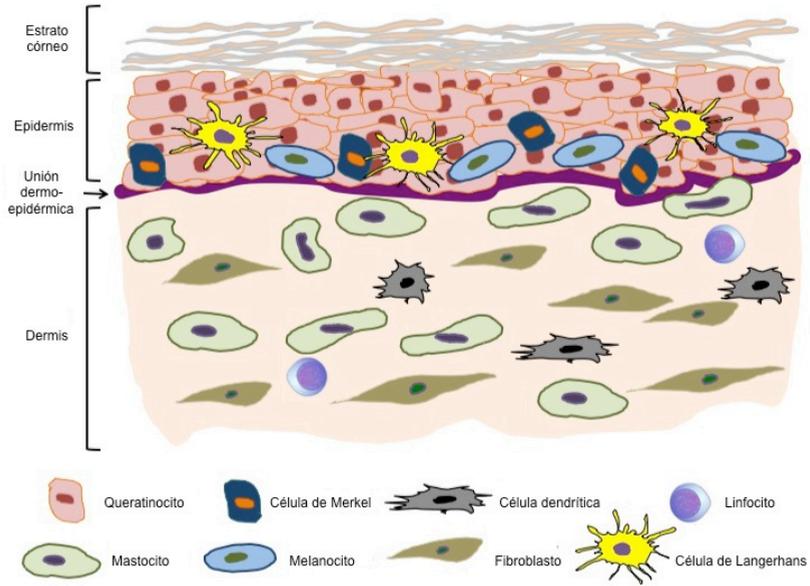
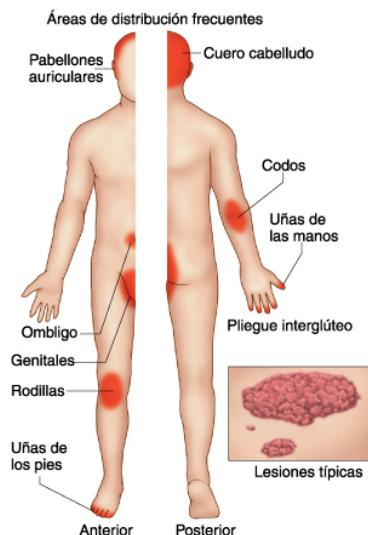


Figura 2. Células presentes en la piel en condiciones fisiológicas.

## 2. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que se caracteriza por un desfiguramiento y descamación cútaneas y por la formación de placas eritomasas que pueden cursar con dolor y, frecuentemente, con prurito. Suele presentar disposición simétrica y las localizaciones más frecuentes son superficies de extensión (codos y rodillas), zona sacra y cuero cabelludo, siendo también común la afectación de las uñas (Figura 3) (Perera y cols., 2012). Dependiendo de sus características morfológicas y su naturaleza, la psoriasis puede clasificarse en *psoriasis vulgaris* o en placa, en gota, inversa, pustular y eritrodérmica. La primera es la forma más común, constituyendo el 80-90% de los pacientes psoriásicos, y se caracteriza por la existencia de maculo-pápulas y placas eritemo-escamosas perfectamente delimitadas. Por otra parte, hasta el 40% de pacientes con psoriasis sufren otras complicaciones asociadas, como la artritis psoriásica, forma de curso más agresivo y altamente incapacitante en la que se ven afectadas las articulaciones (Cantini y cols., 2010).



**Figura 3.** Localización más frecuente de las lesiones psoriásicas.

Con una prevalencia en la población mundial comprendida entre el 1 y el 3%, la psoriasis es un desorden presente durante toda la vida del paciente, de carácter recurrente, con periodos intermitentes de exacerbación y remisión en su expresión. La psoriasis puede aparecer a cualquier edad, aunque existe una mayor incidencia entre los 15 y 20 años y entre los 55 y 60 años (Langley y *cols.*, 2005). Además, afecta por igual a ambos sexos, aunque es más precoz en mujeres (Gelfand y *cols.*, 2005). Asimismo, su prevalencia e incidencia también varían dependiendo de la región, etnia e historia familiar, ya que la psoriasis es una enfermedad con componente genético que puede estar desencadenada o influenciada por factores ambientales (Naldi, 2004; Schon y Boehncke, 2005; Enamandram y Kimball, 2013; Parisi y *cols.*, 2013).

Como hemos comentado, el paciente psoriásico puede presentar tanto periodos libres de enfermedad como exacerbaciones de aparición y duración muy variables. Sin embargo, entre estos pacientes, hasta el 80% la padecerán durante toda su vida, ya sea de forma continua o intermitente. Aunque la mayoría de los casos no afectan a la salud general del paciente y pueden ser tratados en atención primaria, alrededor del 20% sufren manifestaciones más graves por lo que requieren un tratamiento sistémico. Además, con la edad, los pacientes con psoriasis tienen mayor predisposición a padecer otras enfermedades excutáneas, como eventos cardiovasculares, síndrome metabólico, dislipemia, diabetes, aterosclerosis, infarto de miocardio y linfomas, que están directamente relacionados con la inflamación sistémica crónica presente en psoriasis (Kaye y *cols.*, 2008; Gottlieb y Dann, 2009; Davidovici y *cols.*, 2010; Lu y *cols.*, 2013). Por otra parte, esta patología conlleva una importante carga psicosocial sobre el paciente y sus allegados, ya que es una enfermedad que puede resultar visualmente impactante, incitando a la formación de prejuicios, lo cual se traduce en un mayor índice de depresión, ansiedad, obesidad, tabaquismo e ideación suicida en el paciente (Eghlileb y *cols.*, 2007; Kurd y *cols.*, 2010; Basavaraj y *cols.*, 2011; Dauden y *cols.*, 2012).

## 2.1. Fenotipo y características histopatológicas

La psoriasis en placas o *psoriasis vulgaris* se caracteriza por la formación, frecuentemente simétrica, de placas de 1 a 10 cm<sup>2</sup> perfectamente delimitadas (Figura 4). Son placas con escamas blancas o



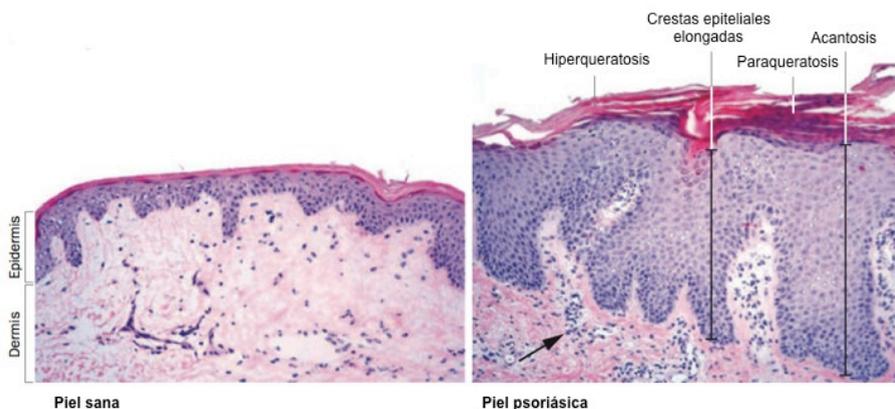
**Figura 4.** Psoriasis vulgaris.

plateadas que cubren superficies variables del cuerpo que con frecuencia revelan pequeños puntos de sangrado al ser extirpadas, fenómeno conocido como signo de Auspitz (Langley y cols., 2005). De esta forma, un paciente psoriásico presenta zonas afectadas (piel lesional) y zonas no afectadas (piel no lesional). La gravedad se evalúa mediante una escala bien establecida

conocida como PASI (Psoriasis Area Severity Index) que considera el eritema, la induración y la descamación de las lesiones en diferentes zonas del cuerpo relacionándolas con el área afectada de cada una de ellas. La escala toma valores que van de 0 a 72, siendo 0 la ausencia de enfermedad y 72 la máxima gravedad de la enfermedad (Mease, 2011).

Histológicamente, la psoriasis se caracteriza por un engrosamiento o hipertrofia de la epidermis (acantosis) y una elongación de las crestas epiteliales hacia la dermis debidos al estado hiperproliferativo de los queratinocitos. Asimismo, el estrato más superficial de la epidermis, el córneo, se encuentra engrosado (hiperqueratosis) y presenta queratinocitos todavía provistos de núcleo (paraqueratosis) (Figura 5). Todo ello es debido a una diferenciación alterada de los queratinocitos que mimetiza la “maduración regenerativa” presente transitoriamente en el proceso de curación de heridas. Como consecuencia, se produce una descamación superficial de la epidermis con la consiguiente ruptura de la barrera protectora de la piel (Lowes y cols., 2007).

Otra característica propia de la psoriasis es la presencia eventual de células inflamatorias (neutrófilos e infiltrado mononuclear) en la epidermis que son detectables por inmunotinción (Li y cols., 2008). Adicionalmente, existe una marcada infiltración de leucocitos mononucleares (células T y células dendríticas) acompañada de numerosos vasos sanguíneos en la región papilar de la dermis que rodea las invaginaciones epidérmicas (Figura 5). La dilatación de estos capilares sanguíneos producida por factores angiogénicos es la responsable del visible enrojecimiento de las lesiones psoriásicas (Lowe y cols., 2007).



**Figura 5.** Cambios histológicos característicos de la piel psoriásica. Destaca el engrosamiento del estrato córneo (hiperqueratosis) y la presencia de queratinocitos provistos de núcleo en las capas más superficiales (paraqueratosis) en una epidermis significativamente engrosada (acantosis) cuyas crestas se elongan hacia la dermis. La flecha indica la presencia de infiltrado celular. Adaptado de Wagner y cols., 2010.

## 2.2. Etiología

Aunque la causa exacta de la enfermedad es desconocida, existen distintos factores muy implicados en su desarrollo, entre los que encontramos factores genéticos, con un 71% de psoriasis infantil con historia familiar, un 70% de concordancia en gemelos monocigóticos y un 20% en los dicigóticos; y factores ambientales, tales como infecciones,

estrés y fármacos entre otros (Schon y cols., 2005; Perera y cols., 2012; Prieto-Perez y cols., 2013).

### **2.2.1. Factores genéticos**

Diversos estudios de ligamiento específico de genes candidatos y de asociación genómica (GWAS) han identificado 9 loci en diferentes cromosomas asociados con psoriasis denominados PSORS(1-9). Concretamente, el receptor de Interleucina 23 (IL-23R), IL12B, y la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC-1) HLA-Cw6, están fuertemente asociados con el desarrollo de la enfermedad. Esta última, HLA-Cw6, se encuentra en el loci PSORS1, cuya probabilidad de ser heredado es del 35-50%, siendo así el PSORS más implicado en el desarrollo de la psoriasis (Capon y cols., 2012). Asimismo, distintos estudios han descrito también la existencia de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) en la región promotora del gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Prieto-Perez y cols., 2013).

Por otra parte, también se han descrito genes no relacionados con la respuesta inmunológica que se encuentran involucrados en la organización y diferenciación atípica de queratinocitos, tales como involucrin (IVL) y pequeñas proteínas ricas en prolina (SPRR) (Kulski y cols., 2005).

### **2.2.2. Factores ambientales**

El desencadenamiento y la exacerbación de la patología psoriásica está fuertemente condicionado a factores ambientales.

#### **a) Estilo de vida**

Existen evidencias de que el consumo de alcohol, tabaquismo, estrés, obesidad y ejercicio físico, entre otros, pueden desencadenar o afectar en la evolución de la enfermedad, ya sea de forma directa o indirecta (Dhabhar, 2013; Farkas y Kemeny, 2013).

### *b) Traumatismos físicos*

La aparición de lesiones psoriásicas como consecuencia de un traumatismo físico es conocido como fenómeno de Koebner y puede estar desencadenado por tatuajes (Figura 6), heridas e incluso presión sobre piel no lesional del paciente. Así, la producción de distintos mediadores, como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) liberado por los queratinocitos dañados, o el desenmascaramiento de antígenos tras la ruptura de la estructura epitelial, o ambos, podrían ser los responsables de la aparición de lesiones psoriásicas (Weiss y cols., 2002; Sagi y Trau, 2011; Perera y cols., 2012).



**Figura 6.** Fenómeno de Koebner

### *c) Fármacos*

Distintos fármacos están altamente relacionados con la inducción o exacerbación de la psoriasis:

#### *1) $\beta$ bloqueantes*

Los fármacos más comúnmente asociados con la exacerbación o desencadenamiento de la psoriasis son los  $\beta$  bloqueantes, que actúan impidiendo la unión de los agonistas  $\beta$  a su receptor. Los receptores  $\beta$  adrenérgicos activan la adenilato ciclasa (AC), promoviendo la formación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, el cual actúa como segundo mensajero en distintas vías responsables de la respuesta inflamatoria y de la diferenciación y la proliferación celular. Por tanto, los  $\beta$  bloqueantes disminuirían el AMPc intracelular alterando la tasa de proliferación y el grado de diferenciación de distintas células, como queratinocitos y linfocitos (O'Brien y Koo, 2006; Basavaraj y cols., 2010).

### *II) Antiinflamatorios no esteroideos*

Aunque el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) no está contraindicado en pacientes psoriásicos, existen diversos casos clínicos en los que se refiere una exacerbación de la psoriasis tras la administración de indometacina y fenilbutazona. En este sentido, la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa (COX) produciría un aumento de leucotrienos sintetizados por la 5-lipooxigenasa (5-LO), directamente relacionados con el agravamiento de la psoriasis (Basavaraj y cols., 2010). Sin embargo, las prostaglandinas (PGs) sintetizadas por la COX son mediadores inflamatorios que pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Concretamente, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) puede presentar efecto antiinflamatorio en determinadas condiciones suprimiendo la producción de citocinas proinflamatorias a partir de células dendríticas (Shiraishi y cols., 2008) o inhibiendo la producción de CCL27 producida por activación de receptores prostanoideos de queratinocitos psoriásicos (Kanda y cols., 2004). Asimismo, también está implicada en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio conocido como M2 (Liu y cols., 2012; Ylostalo y cols., 2012).

### *III) Litio*

El mecanismo por el cual el litio induce o exagera la psoriasis no está claramente descrito. Sin embargo, es conocido su papel en la modulación de sistemas de mensajeros secundarios, tales como la AC y el inositol monofosfato, que participan en la homeostasis de calcio, vital en la señalización del proceso de mitosis. Asimismo, la administración crónica de litio inhibe la COX-2 y la PGE<sub>2</sub> (Bosetti y cols., 2002; Basavaraj y cols., 2010; Tu y Bikle, 2013).

### *IV) Antimaláricos*

Se estima que hasta el 18% de los pacientes psoriásicos desarrollan exacerbaciones de su enfermedad tras la administración de fármacos

antimaláricos. Sin embargo, contrariamente al litio y a los  $\beta$  bloqueantes, los antimaláricos no son capaces de desencadenar la patología, únicamente pueden agravarla. El mecanismo principal por el cual son capaces de exacerbar la psoriasis se debe a la inhibición de la enzima transglutaminasa, implicada en la proliferación de los queratinocitos. Por otra parte, los antimaláricos también actúan como antagonistas de las prostaglandinas y leucotrienos, ya que inhiben la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Kalia y Dutz, 2007; Basavaraj y cols., 2010).

### V) *Tetraciclinas*

Estos antibióticos reducen el AMPc intracelular e interactúan con el ácido araquidónico y sus metabolitos. Además, debido a su naturaleza fotosensibilizante, los pacientes psoriásicos pueden experimentar el fenómeno de Koebner con facilidad (Basavaraj y cols., 2010).

### VI) *Otros*

Otros fármacos como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), benzodiazepinas e inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina (IECA) se relacionan también con la aparición de la patología psoriásica o el agravamiento de la misma (Kim y Del Rosso, 2010).

### d) Infecciones

Numerosos estudios han demostrado la relación existente entre infecciones estreptocócicas del tracto respiratorio y la forma aguda de psoriasis en gotas. El mecanismo según el cual desencadenaría la enfermedad estriba en la liberación de IFN $\gamma$  por las células T circulantes, que posteriormente migrarían a la piel produciéndose una reacción cruzada contra antígenos de queratina. Esto es debido a la homología existente entre la proteína estreptocócica M y las citoqueratinas 16 y 17 (CK16, CK17) presentes en queratinocitos hiperproliferativos (Valdimarsson y cols., 2009; Monteleone y cols., 2011; Chong y cols., 2013).

## 2.3. Inmunopatogénesis

La psoriasis se caracteriza por una alteración en la barrera epidérmica que puede ser la causa o la consecuencia de una respuesta inflamatoria que se prolonga más allá de la curación de heridas y fase de remodelación del tejido. Por ello, debido a las muchas semejanzas existentes entre la reepitelización y la psoriasis, muchos investigadores consideran que las lesiones psoriásicas representan un proceso de cicatrización de heridas persistente (Lai y cols., 2012; Morhenn y cols., 2013).

Es una enfermedad compleja, que requiere respuestas inmunes dinámicas de todos los tipos celulares implicados. De esta forma, es probable que durante las etapas de la enfermedad, como son la iniciación, progresión, el mantenimiento, y la remisión, se produzca un cambio en la dominancia de la respuesta inmune y del tipo celular (Bowcock y Krueger, 2005).

### 2.3.1. Tipos celulares en psoriasis

Los tipos de células principales identificados dentro de las placas psoriásicas son los queratinocitos, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos.

Los **queratinocitos** son el tipo celular más alterado en psoriasis, presentando una diferenciación terminal incompleta y una alteración de las vías implicadas en la proliferación de las células precursoras de los mismos, con una expresión disminuida de los marcadores de diferenciación tardía, como son la filagrina, loricrina y caspasa-14, y una expresión aumentada de los marcadores de diferenciación temprana: involucrina, y pequeñas proteínas ricas en prolina. Así, los queratinocitos psoriásicos muestran un fenotipo distinto a los queratinocitos diferenciados, expresando CK6, CK16, y CK17; y secretan diversas citocinas y factores angiogénicos, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre otros, que

actúan promoviendo la migración de leucocitos y la activación de las células residentes (Costa y cols., 2007; Sweeney y cols., 2011; Perera y cols., 2012).

Las **células dendríticas** son las células centinela de la respuesta inmune y son las responsables de conectar la inmunidad innata con la adaptativa actuando como células presentadoras de antígenos (APC). Las células dendríticas se clasifican en **células de Langerhans**, células dendríticas mieloides (mDC) y células dendríticas plasmocitoides (pDC). Las primeras son un tipo especial de células dendríticas que, a diferencia de las anteriores, se originan de precursores hematopoyéticos localizados en la piel antes del nacimiento (Hoeffel y cols., 2012). Diversos estudios remarcan una alteración en la capacidad migratoria de estas células en psoriasis, viéndose así comprometida la regulación de la respuesta inmunológica (Cumberbatch y cols., 2006; Shaw y cols., 2010; Shaw y cols., 2014). Asimismo, otros estudios destacan la alteración funcional de LC en situaciones de estrés en individuos sanos, indicando de esta manera una comunicación entre la piel, el sistema inmune y el sistema nervioso que podría explicar cómo el estrés contribuye en psoriasis mediante la modulación de este tipo celular (Kleyn y cols., 2008).

Las **células dendríticas plasmocitoides** constituyen un 0,2-0,8% de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y están especializadas en la respuesta frente a virus a través de receptores Toll-like (TLR) (Liu, 2005). Los TLR7 y TLR9 reconocen ARN y ADN monocatenario respectivamente y producen la liberación rápida de grandes cantidades de IFN tipo I, especialmente IFN $\alpha$ . La exacerbación de psoriasis producida por imiquimod (agonista TLR7), la existencia de grandes cantidades de IFN junto con la presencia de un gran número de pDC en la piel psoriásica, señalan una función destacada de las pDC en la patogénesis de la enfermedad (Nestle y cols., 2005). Las pDC no suelen encontrarse en piel sana, sin embargo, sí que son visibles en piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis (Sweeney y cols., 2011). Los altos niveles hallados

de la proteína quimiotáctica quemerina, producida por los fibroblastos adyacentes a la lesión psoriásica, podrían promover la migración de este tipo celular desde los capilares sanguíneos a la dermis (Albanesi y cols., 2009).

El gran número de **células dendríticas mieloides** presentes en la dermis psoriásica sugiere un papel importante de este tipo celular en psoriasis. Diversos estudios han demostrado que las DC presentes en las lesiones psoriásicas pueden polarizar la respuesta inmunológica hacia una respuesta del tipo Th1/Th17 (Nestle y cols., 1994; Zaba y cols., 2009). Las mDC son activadas por citocinas proinflamatorias, como IFN $\alpha$  producido por pDC, IL-6 y TNF $\alpha$  liberado por los queratinocitos. Una vez activadas las mDC liberarían IL-23 y TNF $\alpha$  que estimularían la producción de IFN $\gamma$  e IL-17 por linfocitos Th1 (Nestle y Conrad, 2004), activando de esta manera el eje IL-23/Th17.

Los **neutrófilos** son células fagocíticas que también presentan funciones como APC a través de la expresión de MHC-I y MHC-II. Multitud de estudios sugieren que los neutrófilos contribuyen estrechamente en la patología psoriásica. Los neutrófilos se acumulan en las zonas lesionadas y producen una gran variedad de citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  e IL-17 (Sweeney y cols., 2011).

Los **macrófagos** también están presentes en las lesiones psoriásicas. Son células fagocíticas con capacidad APC que producen IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , iNOS y la proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1). Además, son los principales productores de TNF $\alpha$  (Wang y cols., 2006; Marble y cols., 2007). La efectividad de las terapias biológicas basadas en la neutralización del TNF $\alpha$  y la mejora de la patología psoriásica observada en modelos animales tras la supresión de este tipo celular, ponen de manifiesto una función esencial de los macrófagos en psoriasis (Stratis y cols., 2006; Wang y cols., 2009).

La liberación sostenida de distintos mediadores proinflamatorios secretados fundamentalmente por los tipos celulares anteriormente citados, junto con la interacción de las DC con los linfocitos en los nódulos linfáticos, conlleva la activación y extravasación de estos últimos a la dermis, donde liberarán diversas citocinas, como IL-17, IL-22, IL-18 e IFN $\gamma$ , que producirán la sobreestimulación de las células residentes para tratar de erradicar el antígeno o factor desencadenante de la patología (Perera y *cols.*, 2012).

Un tipo especial de linfocitos hallados en psoriasis y otras patologías autoinmunes son los **linfocitos Th17**. Diferenciadas a partir de células T naïve en la presencia de TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23, los Th17 liberan IL-17A e IL-17F que actúan promoviendo el reclutamiento, activación y migración neutrofilica (Kagami y *cols.*, 2010; Perera y *cols.*, 2012).

Por otra parte, no debemos olvidarnos del tipo celular mayoritario en la dermis: el **fibroblasto**. Estas células constituyen una red de apoyo fundamental para mantener la integridad del tejido conectivo, ya que son los principales responsables de la síntesis y remodelación de la matriz extracelular. Además, ante un daño tisular, promueven procesos de cicatrización por lo que también son fundamentales en la reparación del tejido afectado.

Tradicionalmente se ha considerado a los fibroblastos como células de parénquima que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cutánea. Sin embargo, recientemente ha sido demostrado que también actúan como células del sistema inmunitario. Se sabe que los fibroblastos tienen la capacidad de secretar mediadores inflamatorios que, ante una señal de peligro, promueven la infiltración de células inmunocompetentes desde el torrente sanguíneo a la epidermis. Ahora, estudios recientes indican que podrían estar implicadas en el desarrollo y cronificación de la respuesta inflamatoria en determinadas patologías autoinmunes como la artritis reumatoide o la psoriasis (Buckley y *cols.*, 2004; Buckley, 2011). Concretamente, los fibroblastos podrían contribuir a la

patogénesis de la psoriasis secretando mediadores solubles implicados en la activación de células residentes y el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y monocitos (Schirmer y cols., 2010). Por tanto, podrían actuar relacionando la respuesta inmune innata y adquirida constituyendo así una posible e interesante diana terapéutica en el control de patologías inflamatorias crónicas.

### **2.3.2. Mediadores inflamatorios**

#### *a) Citocinas*

Las citocinas más implicadas en la patogénesis de esta enfermedad corresponden a aquellas cuyo bloqueo terapéutico mediante anticuerpos específicos consigue revertir significativamente la sintomatología de la misma. Este es el caso del TNF $\alpha$  (y sus correspondientes anticuerpos Infliximab, Adalimumab, Etanercept), o las citocinas IL-23/IL12 (y su anticuerpo Ustekinumab) (Sivamani y cols., 2010).

El TNF $\alpha$  es una de las principales citocinas asociadas a la inmunidad innata y a la respuesta inflamatoria en psoriasis (Nickoloff y Nestle, 2004). Esta citocina se encuentra elevada en suero y tejido durante procesos infecciosos e inflamatorios, como la psoriasis; mientras que no suele ser detectable en individuos sanos.

Aunque la principal fuente de producción de TNF $\alpha$  en enfermedades inflamatorias son los monocitos/macrófagos y los linfocitos T, gran diversidad de tipos celulares, como neutrófilos, células natural killer (NK), células endoteliales, linfocitos B, células dendríticas, queratinocitos y fibroblastos, son capaces de producirlo (Bradley, 2008).

El TNF $\alpha$  producido por estas células inicia una cascada de activación que amplifica y mantiene la respuesta inflamatoria en la placa psoriásica (Bos y cols., 2005) ya que induce otras citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores de transcripción, como el factor nuclear de las cadenas

ligeras  $\kappa$  de células B activadas (NF- $\kappa$ B). Este complejo transcripcional es responsable a su vez de la regulación de la expresión génica de distintas citocinas inflamatorias, tales como IL-8, IL-6 o el propio TNF $\alpha$ , siendo por tanto fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria e inmunológica (Hayden y Ghosh, 2011). El TNF $\alpha$  actúa a través de su unión a receptores específicos de membrana TNFR1 o TNFR2, que tienen mecanismos distintos de señalización que además dependen del tipo celular y su estado de activación (Faustman y Davis, 2010).

La **IL-23** es una citocina heterodimérica compuesta por una subunidad IL-23p19 característica y una subunidad IL-12/23p40 que es común a la IL-12 (Oppmann y *cols.*, 2000). En psoriasis es producida predominantemente por DC. Tras unirse a su receptor específico, la IL-23 ejerce sus efectos a través de la activación de la vía de señalización de STAT3 (Di Cesare y *cols.*, 2009), promoviendo la formación de Th17 y la diferenciación aberrante de los queratinocitos (Perera y *cols.*, 2012).

Otras citocinas implicadas en el desarrollo de la psoriasis son la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-8. La primera, la **IL-1 $\beta$** , es una citocina con gran poder proinflamatorio e inmunomodulador que, en psoriasis, es significativamente secretada por queratinocitos. Otros tipos celulares como LC, células endoteliales activadas, monocitos/macrófagos y fibroblastos también son productores de esta citocina (Ravindran y *cols.*, 2004). La IL-1 $\beta$  promueve la proliferación de linfocitos, neutrófilos, y macrófagos, así como la liberación de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 (Pietrzak y *cols.*, 2008). Además induce intensamente la expresión de COX-2 (Yang y *cols.*, 2005).

La **IL-6** es secretada por todos los tipos celulares presentes en la placa psoriásica. Se encuentra de forma constitutiva en piel sana, sin embargo, los niveles detectados de esta interleucina en biopsias y plasma de pacientes psoriásicos son significativamente superiores (Zalewska y *cols.*, 2006). La IL-6 provoca la activación de linfocitos, la inducción de la respuesta de fase aguda y la activación y movilización de células

dendríticas a través de la vía de señalización de STAT3 (Kopf y cols., 2010). Asimismo, teniendo en cuenta que la IL-6 actúa sinérgicamente con TNF $\alpha$ , parece ser que también contribuye a través de su acción sobre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Wang y cols., 2013).

La **IL-8** es un miembro de la familia de las quimiocinas CXC y fue inicialmente identificada como un factor activador de neutrófilos. Desde entonces, se le han atribuido una gran cantidad de actividades proinflamatorias, incluyendo la activación de células inmunitarias, el poder quimiotáctico y la angiogénesis (Rosenkilde y Schwartz, 2004). Esta quimiocina puede ser producida por una gran cantidad de células implicadas en la inflamación, como son los monocitos y las células endoteliales. La liberación de grandes cantidades de IL-8 participa en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la artritis reumatoide, la psoriasis o la pustulosis palmoplantar. En todas ellas se observa una acumulación de neutrófilos y altos niveles de producción de IL-8 (Duan y cols., 2001; Ozawa y cols., 2005). En varios modelos animales de inflamación aguda, anticuerpos neutralizantes de la IL-8 reducen considerablemente la función de los neutrófilos y resuelven la inflamación. Por lo tanto, la neutralización de la actividad de la IL-8 representa una estrategia terapéutica para enfermedades inflamatorias crónicas (Pietrzak y cols., 2008; Skov y cols., 2008).

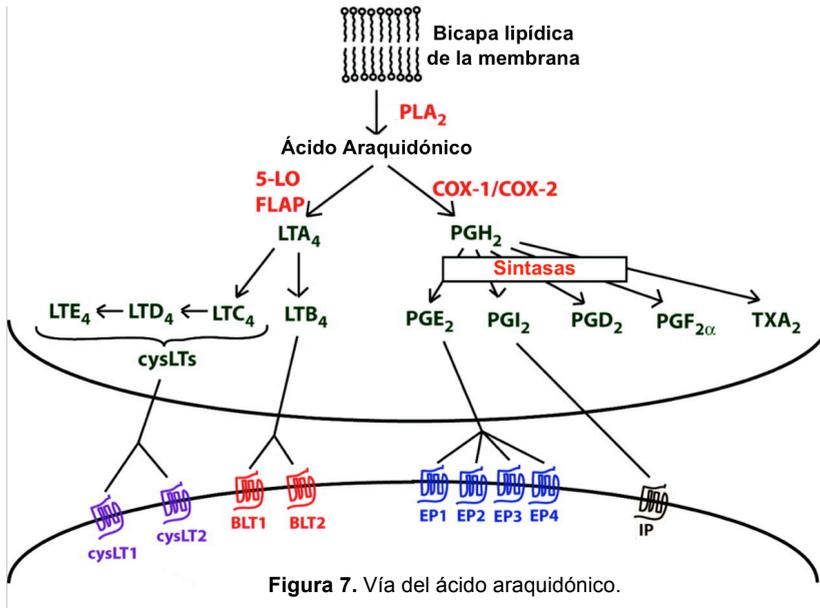
#### *b) Péptido antimicrobiano LL-37*

En el año 2007, Lande y cols destacaron el papel del péptido antimicrobiano **LL-37** como agente instigador de la respuesta inflamatoria. Este péptido, liberado por queratinocitos, mastocitos, neutrófilos y macrófagos en situaciones de daño celular e infecciones, se conjuga con ADN y ARN propio activando de esta forma tanto las pDC a través de los TLR7 y 9, como las mDC a través del TLR8 (Lande y cols., 2007).

### c) *Eicosanoides*

Los eicosanoides son moléculas lipídicas formadas a partir de la oxigenación de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos, principalmente ácido araquidónico, llevada a cabo por la enzima fosfolipasa  $A_2$ . Se clasifican en prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos (LT) y ciertos hidroxiácidos precursores de los leucotrienos. Las prostaglandinas y los tromboxanos se sintetizan en la vía de la ciclooxigenasa, mientras que los leucotrienos y ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) se metabolizan a través de distintas lipooxigenasas. Por su gran implicación en procesos inflamatorios en la piel queremos destacar la  $PGE_2$  y el  $LTB_4$ .

El  $LTB_4$ , sintetizado por la 5-lipooxigenasa (Figura 7), es el leucotrieno con mayor capacidad quimiotáctica y es producido principalmente por neutrófilos. Una vez liberado, permite y promueve la extravasación de este tipo celular al foco inflamatorio y su consiguiente degranulación. *In vitro*, estimula la síntesis de ADN en queratinocitos e induce la pigmentación de melanocitos, indicando su participación en la postpigmentación postinflamatoria (Kragballe y cols., 1985; Morelli y cols., 1992; Ikai, 1999). *In vivo*, la aplicación tópica de  $LTB_4$  induce inflamación de forma dosis-dependiente, con hiperproliferación epidérmica e infiltración neutrofílica en forma de microabcesos (Paulissen y cols., 1990).



Por su parte, la síntesis de la **PGE<sub>2</sub>** comprende la participación de dos grupos de enzimas que actúan secuencialmente en dos etapas tras la intervención de la PLA<sub>2</sub>. La COX-1 (constitutiva) y la COX-2 (inducible) convierten el ácido araquidónico en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Esta última es transformada a PGE<sub>2</sub> por un grupo de isoenzimas denominadas PGE sintasas (PGES) (Bage y cols., 2010), las cuales pueden ser de origen microsomal (mPGES) o citosólico (cPGES). Finalmente, la PGE<sub>2</sub> sintetizada y liberada al espacio extracelular ejerce su acción sobre los cuatro tipos de receptores para PGE<sub>2</sub> (EP1-EP4) (Figura 7) (Ricciotti y FitzGerald, 2011). En la piel, la PGE<sub>2</sub> es mayoritariamente producida por los fibroblastos dérmicos, promoviendo la vasodilatación y la activación local de neutrófilos, macrófagos y mastocitos en los inicios del proceso inflamatorio (Nakayama y cols., 2006; Wang y Lau, 2006; Weller y cols., 2007). Sin embargo, también es capaz de promover la inducción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-10, y la supresión de citocinas proinflamatorias (Takayama y cols., 2002; MacKenzie y cols., 2013), por lo que asume un papel fundamental en la fase resolutoria del proceso inflamatorio.

### 2.3.3. Inicio de la enfermedad

El péptido antimicrobiano LL-37 liberado por un agente desencadenante se conjugaría con ADN y ARN propios, originando la activación de las DC. Éstas migrarían a los nódulos linfáticos para reclutar linfocitos que madurarían a Th1 y Th17. Los linfocitos T migrarían a la zona afectada y, a través de la liberación de IL-17A e IL-17F, ocasionarían la diferenciación aberrante de queratinocitos, y exacerbarían aún más el proceso inflamatorio, produciéndose de esta manera ciclos de retroalimentación positiva entre células de la inmunidad innata y la adaptativa, donde las citocinas y tipos celulares anteriormente descritos participarían activamente perpetuando la inflamación (Figura 8). Sin embargo, en piel sana estos sucesos son controlados y la respuesta inflamatoria no llega a desbordarse, tal y como ocurre en psoriasis. Es aquí donde pensamos que el fibroblasto dérmico podría tener un papel fundamental en el control del proceso inflamatorio.



### 2.3.4. Vías de señalización

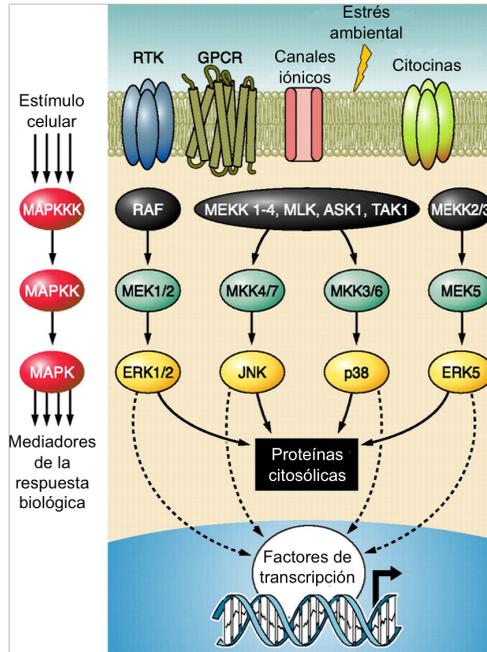
Como hemos visto, la psoriasis es una enfermedad compleja y multifactorial en la que distintos tipos celulares secretan multitud de mediadores inflamatorios. Algunas de las principales vías de señalización implicadas en este proceso se resumen a continuación:

#### a) MAPK

Las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) son proteínas que convierten un estímulo extracelular en una gran cantidad de respuestas celulares a través de fosforilaciones (Figura 9). Todas las células eucariotas poseen varias vías de señalización que implican a las MAPK, las cuales coordinadamente regulan varias actividades celulares, entre ellas, expresión de genes, mitosis, apoptosis o diferenciación celular (Cargnello y Roux, 2011). Las MAPK más estudiadas son las siguientes:

I) *ERK1/2*: Son cinasas reguladoras de la señal extracelular. Existen dos isoformas, ERK1 y ERK2. Estas MAPK se activan por diferentes factores de crecimiento, ligandos de receptores acoplados a proteínas G, citocinas y estrés oxidativo entre otros y juegan un papel fundamental en la proliferación celular. Una vez fosforiladas en el motivo Thr-Glu-Tyr (TEY), las ERK citosólicas se desplazan y acumulan en el núcleo donde ejercerán su acción (Roux y Blenis, 2004).

II) *p38*: Existen cuatro isoformas de p38: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ . Al igual que la ERK, participan en la proliferación celular, sin embargo, también juegan un papel muy importante en la respuesta inmune e inflamatoria actuando en la transcripción de mediadores inflamatorios e incluso en la estabilidad del ARNm que codifica para distintas proteínas implicadas en la inflamación e inmunidad, como la COX-2 y el IFN $\gamma$ . Tras la fosforilación en el motivo Thr-Gly-Tyr (TGY) a través de citocinas, quimiocinas o lipopolisacárido bacteriano (LPS), la p38 activada media su acción tanto en el espacio nuclear como en el citoplasmático (Roux y Blenis, 2004).



**Figura 9.** Simplificación de vía de señalización de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK). La activación de esta vía provoca una cascada de fosforilaciones secuenciales que ocasionan la modulación de distintos factores de transcripción, generando así distintas respuestas biológicas. Adaptado de Rose y cols., 2010.

III) *JNK*: cinasas c-Jun amino terminal. Existen 3 isoformas, JNK1, JNK2 y JNK3, aunque esta última está expresada principalmente en el cerebro. Su activación por mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y factores ambientales, requiere una fosforilación doble en Tyr y Thr del motivo Thr-Pro-Tyr (TPY). La JNK citoplasmática activada fosforila c-Jun, aunque también puede fosforilar complejos transcripcionales (ATF-2, STAT3). La proteína c-Jun fosforilada se desplaza al núcleo donde participa en la constitución de la proteína activadora-1 (AP-1), factor de transcripción compuesto por las proteínas c-Jun, c-Fos, ATF y JDP, que controla procesos celulares, como la diferenciación, proliferación y apoptosis, así como la transcripción de genes implicados en la inflamación (Weston y Davis, 2007).

### b) *NF-κB*

El NF-κB constituye una familia de factores de transcripción clave en los procesos biológicos implicados en la respuesta inmune y la inflamación. Estando presente en la mayoría de las células animales, el complejo transcripcional NF-κB es un sistema dinámico y versátil que se encarga de orquestar tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa.

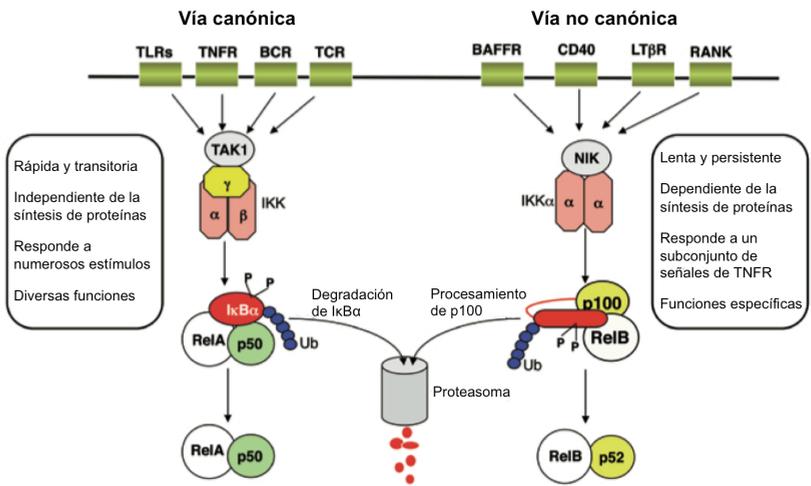
En mamíferos, esta familia está compuesta por cinco factores de transcripción: p50, p52, p65 (también conocida como RelA) RelB y c-Rel, que comparten un dominio de unión al ADN y dimerización N-terminal conocido como dominio Rel, mediante el cual pueden formar homo- y heterodímeros. Los dímeros reconocen regiones específicas del ADN que presentan lugares de unión κB; una vez asociados ejercen una acción moduladora de la expresión génica (Hayden y Ghosh, 2011).

En la mayoría de células, los complejos NF-κB son inactivos y residen predominantemente en el citoplasma unidos a proteínas inhibitoras IκB (κBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, p100, p105, Bcl3, IκBns). Cuando las vías de señalización son activadas, la proteína IκB es degradada y los dímeros de NF-κB entran al núcleo en busca de los genes diana. Generalmente, la etapa común en este proceso es mediada por el complejo IκB cinasa (IKK), el cual fosforila IκB convirtiéndolo en un sustrato para la degradación proteosomal (Liu y Chen, 2011). El complejo IκB consiste en dos cinasas catalíticamente activas, IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) y una proteína reguladora, NEMO (IKKγ). Sin embargo, aunque los miembros integrantes del complejo NF-κB están ampliamente estudiados y caracterizados, existe una complejidad considerable en entender cómo funcionan las proteínas individualmente y cómo coordinan una respuesta concreta (Shih y *cols.*, 2011).

Existen dos vías de señalización del NF- $\kappa$ B, denominadas vía clásica o canónica y vía no canónica que difieren tanto en el factor desencadenante, como en las proteínas que la integran (Figura 10).

I) *Vía canónica*: La activación de la vía desencadena la degradación del I $\kappa$ B, generalmente I $\kappa$ B $\alpha$ , mediada por la enzima IKK. El heterodímero formado por p50/RelA libre se desplaza al núcleo donde iniciará la transcripción del gen o genes que contengan el lugar de unión  $\kappa$ B. Esta vía es la más implicada dentro del control del proceso inflamatorio (Ghosh y Hayden, 2012).

II) *Vía no canónica*: La proteína RelB se encuentra en el citoplasma unida a p100 formando un heterodímero inactivo. Al activarse la vía no canónica, se induce el procesamiento de p100, la cual da lugar a la proteína p52 que, junto con la RelB, se desplazan al núcleo celular (Razani y cols., 2011; Sun, 2011).



**Figura 10.** Características generales de la vía clásica y la vía no canónica de activación del complejo NF- $\kappa$ B. Adaptado de Sun, 2011.

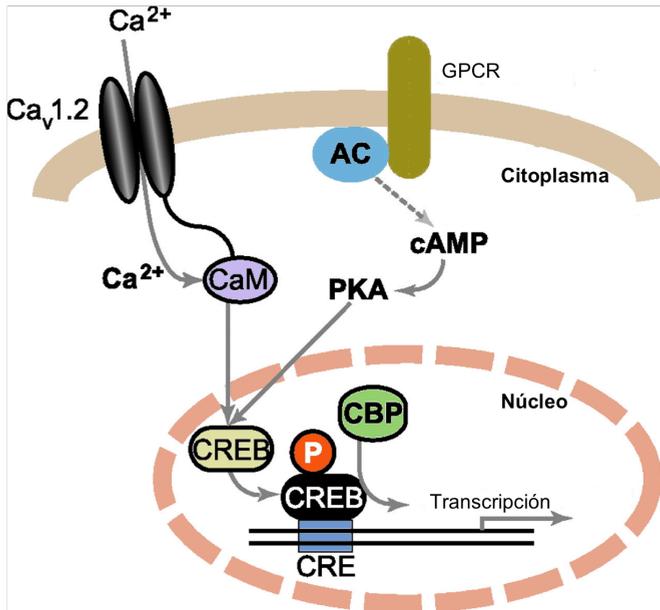
Sin embargo, es importante destacar que ambas vías de señalización no actúan de forma independiente, sino que convergen en distintas etapas e

incluso interaccionan potenciando o atenuando la señal desencadenante (Razani y cols., 2011).

El NF- $\kappa$ B es responsable de la transcripción de genes que codifican para multitud de citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Además, los objetivos inmediatos de estos mediadores proinflamatorios que dependen de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B, como el TNF $\alpha$ , tienden a ser receptores que, a su vez, activan NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, NF- $\kappa$ B es crucial para la propagación y la elaboración de las respuestas inflamatorias. El TNF $\alpha$  es particularmente importante tanto para la inflamación local como para la sistémica, y es un inductor potente y bien estudiado de NF- $\kappa$ B (Hayden y Ghosh, 2011). Como se ha comentado con anterioridad, esta citocina está altamente asociada a la inmunopatogénesis de la psoriasis, por tanto, aquellas moléculas que interfieran en la vía de señalización del NF- $\kappa$ B presentarán un importante interés farmacológico.

### c) CREB

CREB es un factor de transcripción que regula diversas respuestas celulares, incluyendo la proliferación, la supervivencia y la diferenciación. Una vez inducido por distintos factores de crecimiento y señales inflamatorias, CREB media la transcripción de genes que contienen un elemento de respuesta a AMPc (CRE). Varios genes relacionados con la inmunidad y la inflamación poseen este elemento de respuesta a AMPc, incluyendo la IL-2, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  y COX-2. Asimismo, la activación de CREB mediante su fosforilación inhibe directamente la activación del complejo NF- $\kappa$ B al bloquear la formación del complejo transcripcional nuclear, limitando de este modo la respuesta proinflamatoria (Medzhitov y Horng, 2009).



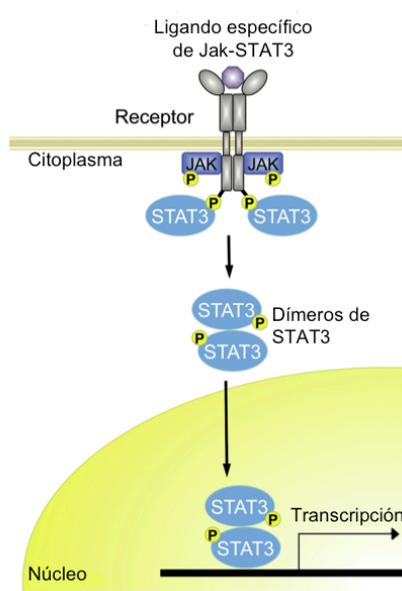
**Figura 11.** Vía de señalización de CREB. La activación de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) o el calcio pueden fosforilar a CREB que, acoplado a la proteína CBP y/o p300, iniciará la transcripción de los genes que presenten una región CRE en su promotor.

La activación de CREB está mediada por un segundo mensajero, AMPc o  $Ca^{2+}$ , que activa una proteína cinasa. Esta proteína cinasa (PKA, PKC) se desplaza al núcleo celular, donde fosforila una proteína de CREB, la cual se une a una región CRE. Para que se active el proceso de transcripción, dos proteínas de unión al CREB, conocidas como CBP y/o p300, deben ser acopladas (Figura 11). Cabe destacar que la vía del CREB también puede ser regulada por las MAPK p38 y ERK, así como la vía del Pi3k/Akt (Wen y cols., 2010).

#### d) STAT3

La vía de las cinasas Janus (Jak)/ transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) está implicada en la respuesta inmunitaria, desarrollo y proliferación celular (Aaronson y Horvath, 2002). La familia de los STAT está compuesta por 7 miembros que actúan como factores de

transcripción. De entre ellos, queremos destacar el STAT3, ya que es el miembro más vinculado a la inflamación e inmunopatogénesis de la psoriasis (Yu y *cols.*, 2009; Miyoshi y *cols.*, 2011).



**Figura 12.** Vía de señalización de Jak/STAT3. La unión del ligando específico al receptor ocasiona la dimerización de éste y la consiguiente fosforilación de las Jak asociadas. Éstas serán las responsables de fosforilar a STAT3, que formará dímeros que se trasladarán al núcleo donde iniciarán la transcripción de genes diana.

La vía de activación de Jak/STAT3 se inicia con la activación de los receptores de citocinas 1 y 2 que, al carecer de un dominio con actividad cinasa intrínseco, se asocian con las Jak. En respuesta a un estímulo, el receptor es fosforilado en un residuo de tirosina por Jak provocando la dimerización del mismo. El receptor fosforilado recluta dos monómeros de STAT3 que se dimerizan al ser fosforilados por Jak en un residuo de tirosina. El dímero STAT3 fosforilado se desplaza al núcleo donde regulará la transcripción de distintos genes (Figura 12) (Levy y Darnell, 2002).

STAT3 también puede ser fosforilado en un residuo de serina, sin embargo, esta fosforilación es llevada a cabo por MAPK, PKC, mTOR o cinasas dependientes de ciclina en respuesta a distintos estímulos (Decker y Kovarik, 2000; Schindler y *cols.*, 2007; Aggarwal y *cols.*, 2009). La fosforilación de este residuo modula la actividad transcripcional de STAT3, aunque el efecto neto parece depender del estímulo y del contexto celular (Decker y Kovarik, 2000).

STAT3 fue inicialmente identificado como un factor de transcripción dependiente de la IL-6 que promueve la expresión de genes en la fase aguda de la inflamación. Hoy en día se conoce que STAT3 integra las respuestas de gran cantidad de mediadores inflamatorios entre los que se encuentran las citocinas de la familia de la IL-6 y de la IL-10, así como factores de crecimiento. Además, también promueve la expresión de genes implicados en la proliferación, supervivencia y angiogénesis (Levy y Lee, 2002; Schindler y *cols.*, 2007; Aggarwal y *cols.*, 2009). En este sentido, el bloqueo de la actividad transcripcional de STAT3 se ha convertido en una diana prometedora para nuevos tratamientos en enfermedades con componente inmunitario, como la psoriasis, e incluso en cáncer (Yu y *cols.*, 2009; Crow, 2012).

## **2.4. Farmacoterapia**

Actualmente, no se dispone de ningún tratamiento curativo para la psoriasis. Por ello, la finalidad de los tratamientos antipsoriáticos es mejorar los síntomas y disminuir tanto la gravedad como la extensión de las lesiones. Existen diferentes tratamientos tópicos y sistémicos, así como la fototerapia, y la elección de uno u otro depende de la gravedad, extensión, perfil beneficio-riesgo, preferencias del paciente y de la respuesta al tratamiento (Raut y *cols.*, 2013).

El tratamiento tópico incluye la aplicación de corticoides, antralinas, alquitranes y derivados de la vitamina D (Calcipotriol), que suelen emplearse a menudo en terapias combinadas.

La fototerapia y la fotoquimioterapia basan su eficacia en la observación del efecto beneficioso de la luz solar en los enfermos con psoriasis. La más empleada es la PUVA, la cual combina la administración de psoralenos con la radiación con luz ultravioleta A de la zona afectada.

El tratamiento sistémico incluye una gran variedad de fármacos, entre los que encontramos el metotrexato, los retinoides, la ciclosporina A y los agentes biológicos (Alefcept, Etanercept, Infliximab, Adalimumab y Ustekinumab). El diseño de estos últimos ha supuesto una auténtica revolución en el tratamiento de la psoriasis, sin embargo, debido a su elevado coste, a su vía de administración parenteral y al riesgo de aparición de reacciones adversas graves, estos fármacos únicamente se administran en las formas más severas de la enfermedad.

Dentro de los antipsoriásicos de acción sistémica, el **metotrexato** es uno de los agentes inmunosupresores más prescritos por los dermatólogos desde su síntesis en 1950. Debido a su similitud estructural con el ácido fólico, el metotrexato actúa como antimetabolito inhibiendo la proliferación celular. Sin embargo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes crónicas como la psoriasis, es habitual combinarlo con suplementos de ácido fólico sin que su acción antiinflamatoria se vea comprometida (Bangert y Costner, 2007). En base a estas observaciones, diversos estudios en modelos animales demostraron que el metotrexato promueve la acumulación extracelular de adenosina en los tejidos inflamados y que este mecanismo es esencial para su acción antiinflamatoria (Cronstein y cols., 1993; Morabito y cols., 1998; Montesinos y cols., 2000). Además se observó que la ingesta de cafeína, que se comporta como antagonista no selectivo de la adenosina, puede disminuir la eficacia del tratamiento con metotrexato en pacientes con artritis reumatoide (Nesher y cols., 2003). Por

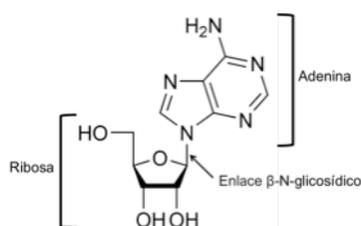
último, los polimorfismos que afectan a la vía de la adenosina en pacientes tratados con metotrexato son indicadores de la buena o mala respuesta al tratamiento (Wessels y *cols.*, 2006).

Por otra parte, el **apremilast** (Otezla<sup>®</sup>), un inhibidor de la hidrólisis de AMPc a AMP llevada a cabo por la fosfodiesterasa 4, demostró una reducción del 75% en el PASI en pacientes con psoriasis y artritis psoriásica durante la Fase III (Palfreeman y *cols.*, 2013) y ha sido recientemente autorizado por la FDA para el tratamiento de la artritis psoriásica.

Por lo tanto, el mecanismo de acción del metotrexato y los resultados prometedores del apremilast en psoriasis, junto con el hecho de que determinados fármacos que alteran los niveles de AMPc producen exacerbaciones o desencadenamiento de la enfermedad (beta bloqueantes, litio y tetraciclinas) sugieren un papel fundamental de la adenosina en psoriasis.

### 3. Adenosina

La adenosina es un nucleósido formado por una base púrica (la adenina) y un azúcar (ribosa) unidos mediante un enlace  $\beta$ -N-glicosídico (Figura 13). Formando la base de uno de los nucleótidos que constituyen el ADN y el ARN, la adenosina también participa en procesos bioquímicos



**Figura 13.** Estructura química de la adenosina.

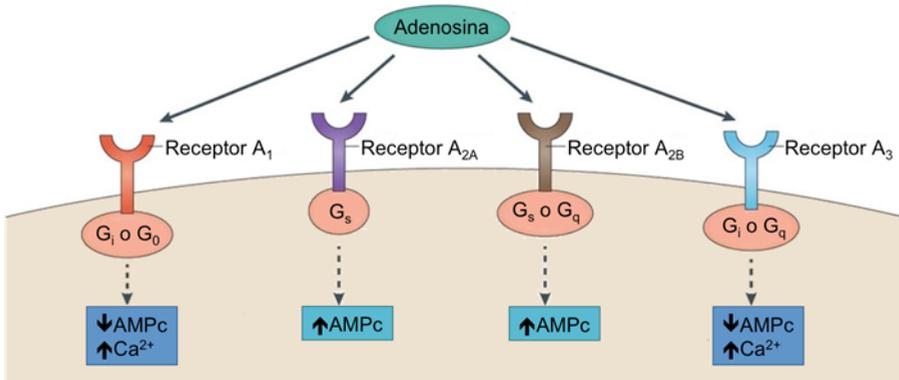
como cofactor en reacciones redox (NADPH y FADH), así como transportador de energía mediante la unión con el fosfato formando los nucleótidos ATP, ADP y AMP. Este último nucleótido, puede transformarse en AMP cíclico, fundamental en la transducción de determinadas señales actuando como segundo mensajero, a

través de la adenilato ciclasa (AC). El proceso inverso está catalizado por fosfodiesterasas (PDE).

#### 3.1. Receptores de adenosina

A nivel extracelular, la adenosina juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo a través de la interacción con cuatro receptores específicos localizados en la superficie celular denominados  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$  (Fredholm *et al.*, 2001). Todos ellos pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G y se diferencian por su distinta afinidad por la adenosina, propiedades farmacológicas, secuencia genética, tipo de proteína G acoplada y vías de señalización (Valls *et al.*, 2009). Los efectos fisiológicos de la adenosina están mediados por los procesos de señalización intracelular que dependen tanto del subreceptor como del tipo celular. De esta forma, los receptores  $A_1$  y  $A_3$  se acoplan a proteínas  $G_i$ , cuya estimulación produce la inhibición de la AC, disminuyendo de esta forma los niveles de AMPc intracelular, o la activación de la fosfolipasa C, que aumenta los niveles intracelulares de calcio (Figura 14). En contraposición, la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ,

acoplados a proteínas Gs, produce un aumento del AMPc intracelular debido a la activación de la AC (Figura 14) (Hasko y cols., 2008; Blackburn y cols., 2009).



**Figura 14.** Esquema general de los receptores de adenosina. La unión de la adenosina a los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> genera el aumento de AMPc intracelular al activar la adenilato ciclasa (AC). En cambio, la activación de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> disminuye los niveles de AMPc intracelular al inhibir la AC. Por otra parte, la activación de estos dos últimos provoca el aumento de calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC). Adaptado de Antonioli y cols., 2013.

En general, los subtipos de receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>3</sub> poseen gran afinidad por adenosina, activándose a concentraciones 30-300 nM, mientras que el A<sub>2B</sub> presenta menor afinidad y requiere niveles de adenosina superiores a 10  $\mu$ M para su activación (Fredholm, 2007; Valls y cols., 2009). Por tanto, la activación de este último subtipo se da únicamente en condiciones patológicas en las que los niveles de adenosina pueden alcanzar los 100  $\mu$ M (Hasko y Cronstein, 2004; Hasko y cols., 2008). Además de la concentración de adenosina, otros factores como la densidad de receptores o la funcionalidad de las vías de señalización intracelulares asociadas son también determinantes de la naturaleza y magnitud de las respuestas celulares (Hasko y cols., 2008).

### 3.2. Adenosina extracelular y metabolismo

Existen dos fuentes de origen de adenosina extracelular. La primera consiste en el transporte al exterior de adenosina intracelular. Como la adenosina está implicada en prácticamente todas las rutas metabólicas, la mayoría de las células poseen transportadores (ENT) que se encargan de equilibrar, mediante un transporte rápido, la concentración de adenosina requerida. La segunda fuente es la ruptura de nucleótidos de adenina en adenosina a través de dos reacciones enzimáticas consecutivas orquestadas por la ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1 (ENTPD1, también conocido como CD39) y la ecto-5'-nucleotidasa (NT5E, también conocida como CD73), que catalizan la hidrólisis de ATP/ADP a AMP y de ADP a adenosina, respectivamente (Chen y *cols.*, 2013).

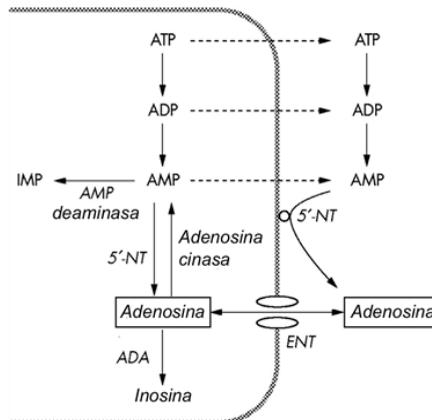


Figura 15. Metabolismo de la adenosina.

Una vez transportada al espacio intracelular, la adenosina puede ser fosforilada por la adenosina kinasa (AdK) para formar AMP o deaminada a inosina por acción de la adenosina deaminasa (ADA). Como consecuencia de la rápida internalización y metabolismo de la adenosina, los niveles de este mediador se mantienen bajos en tejidos sanos. Sin embargo, en condiciones patológicas, el metabolismo de la adenosina no puede compensar su generación, lo que resulta en un marcado aumento de la concentración extracelular (Hasko y *cols.*, 2008).

### 3.3. Adenosina en inflamación

La activación de los receptores  $A_{2A}$  de la adenosina, encontrados en la mayoría de tipos celulares incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, parece disminuir la inflamación en muchos tejidos (Sitkovsky y cols., 2004). A través de la activación de este receptor, la adenosina puede inhibir la activación de células T, la proliferación y la producción de citocinas proinflamatorias, así como aumentar la liberación de citocinas antiinflamatorias. En las primeras fases de la reacción inflamatoria, concentraciones altas de adenosina reducen la infiltración leucocitaria y la activación de células dendríticas, mientras que en las fases tardías, la adenosina contribuye a la resolución de los procesos inflamatorios e inmunes, por favorecer el aumento de la respuesta Th2 frente a Th1 (Hasko y Cronstein, 2004).

Estudios recientes, han demostrado que la administración de un agonista del receptor  $A_{2A}$ , es capaz de reducir la progresión de la artritis en modelos animales de experimentación (Mazzon y cols., 2011; Vincenzi y cols., 2013). Asimismo, estudios realizados en modelos de ratones knockout han puesto de manifiesto la relación entre el receptor  $A_{2A}$  de adenosina con el efecto antiinflamatorio del metotrexato (Montesinos y cols., 2003; Jacobson y Gao, 2006), por lo que consideramos que un agonista selectivo de este receptor podría presentar resultados positivos en psoriasis, reduciendo de esta manera los múltiples efectos adversos de este fármaco.



# OBJETIVOS

---



En los últimos años, tanto el conocimiento de la etiología de la psoriasis como la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, son objeto de primera línea de investigación, ya que a pesar de las nuevas terapias biológicas, la mayoría de los pacientes presentan formas menos graves de la enfermedad y siguen disponiendo de pocas opciones terapéuticas. De hecho los tratamientos vía tópica se reducen prácticamente al empleo de corticoides o análogos de la vitamina D.

A pesar de sus conocidos efectos adversos, el metotrexato sigue considerándose un agente de primera línea en el tratamiento oral de la psoriasis. Diversos estudios indican que sus efectos antiinflamatorios están en parte mediados por el aumento de adenosina y la consiguiente activación del receptor  $A_{2A}$ . En este sentido, se ha demostrado que los agonistas  $A_{2A}$  son capaces de favorecer la cicatrización de heridas y también controlar la reacción inflamatoria artrítica en diversos modelos animales de experimentación. Por lo tanto, cabe pensar que la aplicación tópica de estos agonistas podría mejorar tanto la respuesta inflamatoria como la homeostasis tisular en el tratamiento de patologías inflamatorias de la piel, como la psoriasis.

Por otra parte, el elevado ritmo de recambio de los queratinocitos en la epidermis psoriásica, va acompañado de una compleja respuesta inmuno-inflamatoria que cronifica el proceso y da lugar a la aparición de exacerbaciones. Es sabido, que en condiciones normales, los fibroblastos, principales células de la dermis, controlan el recambio de queratinocitos y favorecen la homeostasis de la piel mediante la síntesis de factores solubles y proteínas de la matriz extracelular. Sin embargo, el papel de este tipo celular en psoriasis ha sido poco estudiado, y aunque existe cierta controversia, diversos autores indican que podría contribuir activamente en la patogénesis de la enfermedad a través de la liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas o  $PGE_2$ .

A la vista de estos antecedentes, los dos principales objetivos del presente trabajo han sido:

1. Determinar si la aplicación tópica de un agonista selectivo del receptor  $A_{2A}$  de adenosina podría ser beneficioso en el tratamiento de patologías inflamatorias de la piel, como la psoriasis.
2. Establecer el papel de los fibroblastos dérmicos en el desarrollo de la patogenicidad y la cronificación de la psoriasis.

El desarrollo de estos dos objetivos ha hecho que el presente trabajo conste de dos partes bien diferenciadas:

En la primera parte se ha evaluado el efecto de CGS-21680 (agonista selectivo de los receptores  $A_{2A}$  de la adenosina) tras su aplicación tópica en un modelo de hiperplasia en piel de ratón inducida por TPA, el cual reproduce algunos de los cambios bioquímicos e histopatológicos de la psoriasis humana.

En la segunda parte, se ha realizado un estudio comparativo entre fibroblastos sanos y fibroblastos de individuos diagnosticados de psoriasis, con el fin de establecer las posibles diferencias en cuanto a su capacidad de crecimiento y de respuesta frente a diversos estímulos inflamatorios.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. *In vivo*: Modelo de hiperplasia en piel de ratón

En la presente Tesis hemos utilizado el modelo animal de hiperplasia epidérmica inducida por 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en ratón. Dicho modelo reproduce ciertos parámetros bioquímicos e histopatológicos de enfermedades inflamatorias cutáneas que cursan con hiperproliferación epidérmica, como la psoriasis (Sato y *cols.*, 2004; Amigo y *cols.*, 2007; Andres y *cols.*, 2013).

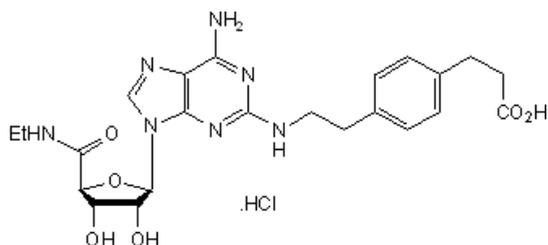
### 1.1. Animales de experimentación

Utilizamos ratones hembra Swiss CD1 (Janvier, Le Genest St Isle, Francia) de 6-8 semanas de edad y 25-30 gramos de peso. Durante el experimento, los animales son mantenidos en una habitación con una temperatura y luz adecuada, con libre acceso a comida y agua. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la normativa europea para el manejo y uso de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación y Bienestar Animal de la Universitat de València (Anexo).

### 1.2. Molécula en estudio

Se ha estudiado el efecto que presenta el CGS-21680 (2-[4-[[2-carboxietil]fenil]etilamino]-5'-*N*-etilcarboxiamidoadenosina) tras su administración tópica en este modelo.

El CGS-21680 (Tocris Bioscience, Ellisville, EEUU) es un agonista selectivo de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  ( $K_i = 27$  nM) que ya ha sido empleado en diversos protocolos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, en los que ha permitido demostrar el efecto beneficioso de la activación del receptor  $A_{2A}$  en diferentes condiciones fisiopatológicas (Michael y *cols.*, 2010; Ferenbach y Hughes, 2011; Garcia y *cols.*, 2011; Mazzon y *cols.*, 2011).



**Figura 16.** Estructura química del CGS-21680

### 1.3. Protocolo experimental

- Día 0: Rasuramos el dorso de los ratones con una maquinilla eléctrica. Seguidamente, depilamos con crema depilatoria (Deliplus, Barcelona, España).
- Día 1: Transcurridas 24h, los animales que no muestran crecimiento de pelo son seleccionados y clasificados en cinco grupos (6-8 ratones/grupo) en función del tratamiento.
  - Grupo 1: Blanco (Vehículo)
  - Grupo 2: Control (TPA)
  - Grupo 3: Blanco CGS-21680
  - Grupo 4: TPA + CGS-21680
  - Grupo 5: TPA + Dexametasona

Con la ayuda de una micropipeta se aplica CGS-21680 (5  $\mu\text{g}/\text{área}$ , disuelto en acetona 0,1% Dimetilsulfóxido (DMSO), el agente de referencia dexametasona (200  $\mu\text{g}/\text{área}$  disuelto en acetona) o el vehículo (acetona 0,1% DMSO), los cuales son directamente aplicados en la piel del dorso de los animales en dos áreas de 1  $\text{cm}^2$ . Media hora más tarde, se aplica TPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) a la concentración de 2  $\text{nmol}/\text{área}$  disuelto en acetona, en las mismas áreas, excepto en los animales que sirven como blancos (Grupo 1 y Grupo 3).

- Día 2 y Día 3: Se repite el procedimiento detallado en Día 1.
- Día 4: Los ratones son sacrificados por dislocación cervical. Mediante un sacabocados se extraen secciones de 1 cm<sup>2</sup> de la piel tratada que son pesadas en una balanza de precisión para determinar el edema. De cada animal, una biopsia es fijada en paraformaldehído al 4% para realizar posteriormente el estudio histológico. Otra biopsia se congela a -80°C hasta su homogenización.

### **1.4. Homogenización de las biopsias**

Las biopsias, previamente congeladas a -80°C, son traspasadas a un recipiente con N<sub>2</sub> líquido. Seguidamente, se introducen en un cilindro congelado a -80°C y son pulverizadas y compactadas con la ayuda de un pistón y un martillo. El pulverizado obtenido es introducido en un eppendorf con 1 ml de tampón de lisis A (10 mM HEPES pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl) y un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mM DTT, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 µg/ml leupeptina, 0,1 µg/ml aprotinina, 0,5 mM PMSF).

Tras sonicar en hielo (3 ciclos de 10 segundos) e incubar durante 10 minutos a 4°C, se procede a la centrifugación de los homogenados (3.000xg, 10min, 4°C), recogiendo los sobrenadantes que se almacenan a -80°C hasta la determinación de los distintos parámetros de estudio.

### **1.5. Determinación de parámetros inflamatorios**

#### **1.5.1. Actividad mieloperoxidasa**

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosomal presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Esta enzima utiliza el peróxido de hidrógeno generado tras la activación del neutrófilo para oxidar iones Cl<sup>-</sup> presentes en el medio, dando lugar al ácido hipocloroso, un potente agente oxidante al cual se le atribuye la capacidad bactericida del neutrófilo.



Figura 17. Reacción que cataliza la mieloperoxidasa.

### Protocolo experimental

Determinamos la actividad MPO en los homogenados de la piel del ratón como marcador de la migración leucocitaria. El protocolo se basa en el método descrito por De Young *y cols.*, 1989. Se incuban 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante con tampón PBS, tampón fosfato pH 5,4 y peróxido de hidrógeno ( $C_f$  0,3 mM). Tras incubar a 37°C durante 5min se añade el sustrato de la reacción tetrametilbencidina (18 mM) disuelto en dimetilformamida (preparada al 8% en agua destilada). Se incuba durante 3min y se detiene la reacción con acetato sódico 2 M (pH 3,0), determinando la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR2™ (PerkinElmer, Finlandia).

### Reactivos

#### Tampón PBS pH 7,4:

NaCl	8,00 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,16 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/l
KCl	0,20 g/l

#### Tampón fosfato pH 5,4:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0866 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,153 g

### **1.5.2. Determinación de LTB<sub>4</sub> mediante radioinmunoensayo**

Los niveles de LTB<sub>4</sub> en los homogenados se detectan mediante radioinmunoensayo (RIA) (Moroney *y cols.*, 1988). En esta técnica radiométrica se detecta la radioactividad (emisiones  $\beta$ ) presente en una muestra que contiene una cantidad de eicosanoide desconocida. La competencia entre el eicosanoide de la muestra y una cantidad fija de eicosanoide marcado con <sup>3</sup>H, por un anticuerpo específico con un número

limitado de lugares de unión, se traduce, tras la precipitación con charcoaldextrano de la fracción no unida, en unos niveles de radioactividad en cuentas por millón (cpm), que son detectados en un contador de centelleo. Se da una relación inversa entre los niveles detectados de eicosanoide en la muestra en estudio y los niveles de radioactividad (cpm) detectados.

Protocolo experimental:

Los homogenados de las biopsias de piel de ratón son incubados a 4°C con las soluciones tampón, el eicosanoide radioactivo y el anticuerpo, tal y como se detalla en la tabla 1. A las 18h se incorpora el charcoaldextrano y se agitan los tubos. Tras dejarlos reposar durante 10min a 4°C, se centrifugan (15min, 4°C, 1000xg). Finalmente, se recogen los sobrenadantes y se añaden 3 ml de líquido de centelleo (Optiphase, PerkinElmer). La emisión  $\beta$  se detecta en un contador de centelleo Wallac 1450 Microbeta (Trilux, Turku, Finlandia).

Reactivos

Tampón A1: (pH 7,4)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,19g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,6 g/l
BSA	5,1 g/l
Azida sódica	0,1%

Tampón B1: (pH 7,4)

Tampón A1 + NaCl 9 g/l

Charcoal-Dextrano:

0,5 g Dextrano en 100 ml de Tampón A1 + 1 g de Charcoal

Material radioactivo:

<sup>3</sup>H-LTB<sub>4</sub>: (5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, (n)-<sup>3</sup>H) LTB<sub>4</sub> (Amersham, Reino Unido)

**Tabla 1:** Protocolo de RIA

Tubos	Tampón A1 (μl)	Tampón B1 (μl)	Muestras (μl)	Eicosanoide <sup>3</sup> H (μl)	Anticuerpo (μl)	Charcoal-Dextrano
T	400	100	-	100	-	-
NSB	200	100	-	100	-	200
B <sub>0</sub>	100	100	-	100	100	200
Patrones	-	100	100	100	100	200
Muestras	-	100	100	100	100	200

T (Totales), NSB (Unión inespecífica), B<sub>0</sub> (Afinidad máxima del eicosanoide por el anticuerpo)

### 1.5.3. Determinación de CXCL-1 y TNF $\alpha$ por ELISA

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente pueden reaccionar con determinados sustratos, produciendo derivados coloreados que pueden ser medidos espectrofotométricamente. Así podemos detectar la presencia tanto de antígenos como de anticuerpos con una gran sensibilidad.

#### Protocolo experimental

El protocolo se ha realizado según las recomendaciones de los kits de CXCL-1 (PromoCell, Heildelberg, Alemania) y TNF $\alpha$  (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido).

El protocolo en general se basa en cubrir inicialmente una placa de 96 pocillos con el anticuerpo primario o de captura y dejarlo incubar toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lava la placa con un tampón de lavado y se bloquea con la solución de bloqueo durante el tiempo correspondiente. Tras el posterior lavado, se añaden las muestras a analizar y la correspondiente curva patrón. A continuación, se añade el anticuerpo secundario biotinilado

y se incuba durante el periodo indicado. Después de una serie de lavados, se añade la solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa, incubando a temperatura ambiente el tiempo adecuado. Tras sucesivos lavados, se añade la solución de tetrametilbenzidina (TMB). Este sustrato cromogénico es oxidado por la enzima, dando lugar a la aparición de coloración azul. La adición de la solución de ácido sulfúrico 2 N detiene la reacción y vira el color a amarillo. La absorbancia es cuantificada mediante un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR2™ (PerkinElmer, Finlandia) a 450 nm.

### **1.5.4. Determinación de la subunidad p65 fosforilada del complejo NF- $\kappa$ B mediante Western Blot**

La técnica del Western Blot permite visualizar proteínas que han sido retenidas en una membrana sintética, a través de un sistema de detección de quimioluminiscencia. De este modo se puede correlacionar la intensidad de la señal obtenida al revelar la membrana, con la magnitud de la expresión de la proteína en comparación con los blancos y controles del experimento.

#### Protocolo experimental

La concentración de proteínas contenidas en los homogenados se cuantifica por el método Bradford-DC (kit Bio Rad DC Protein Assay, Bio Rad Laboratories, California, USA).

Se resuspenden 30  $\mu$ g de proteína procedente de los homogenados en el tampón de carga reductor o Laemmli (200 mM Tris 1,5 M pH 6,8; 400 mM DTT, 8% SDS, 0,4% Bromofenol, 40% glicerol y agua) con una relación de volúmenes 1:1 y se calientan 5 minutos a 100°C.

Las muestras se separan mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y se transfieren a una membrana PVDF. Posteriormente, la membrana se bloquea durante 1h a temperatura ambiente con leche desnatada al 3% en

tampón salino PBS conteniendo 0,1% de Tween 20. A continuación, se incubó durante 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-p65 fosforilada en Ser436 (Cell Signaling Technology, Beverly, EEUU) (dilución 1:1000) disuelto en tampón salino PBS-Tween 20 conteniendo 5% de BSA.

Por último, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución 1:5000) (Dako, Glostrup, Dinamarca) a temperatura ambiente durante otra hora. Las bandas se visualizan mediante quimioluminiscencia (ECL), debido a la oxidación de una solución de luminol (Armesham, Barcelona, España) cuando entra en contacto con la peroxidasa.

La detección de las proteínas se realiza mediante un sistema computerizado de revelado denominado Autochemi™ System. Este aparato está constituido por un habitáculo oscuro en el que se deposita la membrana con el luminol, y una cámara fotográfica que captura imágenes secuencialmente.

La intensidad de las bandas obtenidas en el revelado de las membranas se determina por densitometría utilizando el programa ImageJ. Los valores de densitometría de la proteína de interés se normalizó respecto a la densitometría de la proteína control GAPDH, revelada en la misma membrana (dilución 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU).

### **1.5.5. Procedimiento histológico**

Las biopsias fijadas en paraformaldehído al 4% son deshidratadas en un gradiente creciente de etanol y tratadas con dos baños de xileno. Tras dos baños de 8h y un tercero durante toda la noche con parafina a 70°C, las biopsias son orientadas e incluidas en la misma utilizando un dispensador (Tissue embedding System Tes 99, Nunningen, Suiza). Una vez enfriados los bloques, se obtienen secciones de 6-8  $\mu\text{m}$  en un microtomo Leica RM 2255 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) que son montados en portaobjetos SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania).

Los cortes histológicos se desparafinan con xileno y se rehidratan en un gradiente decreciente de etanol antes de iniciar el protocolo de la tinción correspondiente.

- Tinción eosina-hematoxilina (H&E)

Tras la rehidratación de las secciones histológicas, se realiza la tinción con hematoxilina de Gill y eosina acuosa al 1% (Panreac, Barcelona, España). Los núcleos celulares son teñidos por la hematoxilina de color violeta azulado, mientras que el citoplasma presenta un color rosáceo debido a la eosina.

- Tinción de colágeno mediante el método Picrosirius Red

Este método nos permite visualizar, mediante luz polarizada, los distintos tipos de fibras de colágeno presentes en el tejido.

### Protocolo experimental:

Después de la rehidratación, los núcleos se tiñen con hematoxilina durante 8min. A continuación, se lavan las secciones histológicas y se mantienen durante 1h en una solución de Sirius Red al 0.1% en una solución acuosa saturada de ácido pícrico. Posteriormente, los cortes se lavan con agua acidificada, se deshidratan en una batería de alcoholes y se montan con medio no acuoso DPX (Panreac, Barcelona, España). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Holanda) equipado con un filtro polarizador y una cámara digital (Nikon Digital Camera DXN 1200) mediante el programa Nikon ACT-1.

- Detección de Ki67 y CK6 mediante inmunohistoquímica

La técnica de la inmunohistoquímica está basada en la detección de antígenos por medio de la unión antígeno-anticuerpo con anticuerpos específicos. Esta técnica nos permite observar al microscopio el antígeno buscado gracias a la conjugación con las enzimas peroxidasa o fosfatasa alcalina.

### Protocolo experimental:

Tras su rehidratación, se lavan los cortes histológicos con PBS. Después de bloquear la actividad peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada, las secciones se someten al rescate antigénico sumergiéndolas en tampón citrato (citrato de sodio 10 mM, pH 6,0) a 90-100°C durante 10min y 30min a temperatura ambiente. Seguidamente, se bloquea la unión inespecífica con una solución de BSA al 2% en PBS durante 15min. A continuación, se incuban toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico de cada tinción: anti-Ki67 (1:200) (Thermo Scientific, Illinois, EEUU) y anti-CK6 (dilución 1:500) (R&D System, Abingdon, Reino Unido). Seguidamente, se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución 1:50) (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, se revela con 3,3' diaminobencidina (DAB) (Vector, California, EEUU) y se realiza la tinción de contraste con hematoxilina diluida al 10% en agua destilada. A continuación, las muestras se deshidratan y se montan con medio de montaje no acuoso DPX (Panreac, Barcelona, España).

### Nota:

Las tinciones de H&E e inmunohistoquímicas realizadas fueron visualizadas en un microscopio Leica DM IL LED (Solms, Alemania) y adquiridas con una cámara digital Leica DFC425 C, mediante el programa Leica Application Suite. Dicho programa también fue empleado para el recuento de las células Ki67 positivas y el grosor de la epidermis. Para ello, cinco campos aleatorios por corte histológico de dos cortes por ratón fueron analizados y promediados. El grosor de la epidermis se determinó dibujando cuatro segmentos por campo conectando el estrato córneo con la región de unión dermoepidérmica

## **2. *In vitro*: Ensayos en fibroblastos sanos y psoriásicos**

En la presente Tesis, los ensayos *in vitro* han sido llevados a cabo utilizando fibroblastos dérmicos humanos.

### **2.1. Aislamiento y cultivo de fibroblastos**

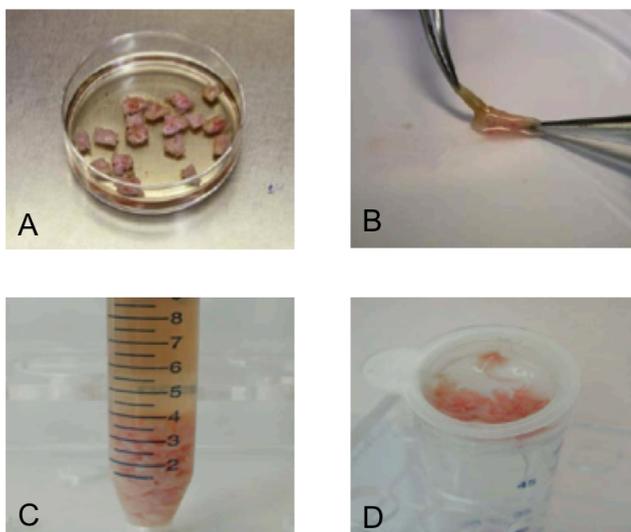
Se dispone de muestras provenientes de individuos sanos y otras de individuos diagnosticados de psoriasis. Las primeras proceden de resecciones quirúrgicas de prepucio obtenidas por el Servicio de Urología del Hospital General Universitario de Valencia, siguiendo el protocolo de Chen y cols., 2007, con ligeras modificaciones. Las segundas son proporcionadas por la Sección de Dermatología del Hospital La Plana de Vila-real (Castellón) procedentes de biopsias realizadas con fines diagnósticos (tras administrar anestesia local). Las muestras psoriásicas pertenecen a individuos de diferente edad y sexo (Anexo).

Todas las muestras provienen de individuos cuya identidad se desconoce. No obstante, se dispone de su consentimiento para la obtención de estas células con fines de investigación. Los estudios realizados cuentan con el informe favorable del Comité Ético de la Universitat de València y cumplen las normas del Hospital General Universitario de Valencia y del Hospital La Plana de Vila-real (Anexo).

Las muestras son recogidas del hospital en frascos estériles. Desde su obtención hasta su procesamiento, las biopsias se encuentran a 4°C con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 20 µg/ml de nistatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU).

### Procesamiento

Tras lavar la muestra con PBS estéril y limpiarla de grasa, se trocea en secciones de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, que se depositan en una placa Petri de 100 mm, manteniendo la epidermis sumergida, dejándolas incubar durante 24h a 4°C con 20 ml de una solución de dispasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) 0,5% en PBS. En el caso de las muestras psoriásicas el volumen de solución de dispasa 0,5% es de 10 ml y las placas Petri utilizadas son de 60 mm, ya que el tamaño de las biopsias es considerablemente menor.



**Figura 18.** Aislamiento de fibroblastos de la piel. **(A)** Incubación de la muestra troceada con dispasa 0,5%. **(B)** Posterior separación de la dermis y la epidermis. **(C)** Incubación de la dermis con una solución de colagenasa 1A. **(D)** Filtrado de la suspensión con un tamiz celular de 0,7 µm.

Pasado este tiempo, la dermis es separada fácilmente con pinzas de la epidermis. Seguidamente los trozos de dermis obtenidos se incuban en 10 ml de solución de colagenasa IA procedente de cepas de *Clostridium histolyticum* al 0,1% en PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU), durante 90min a 37°C en baño con agitación.

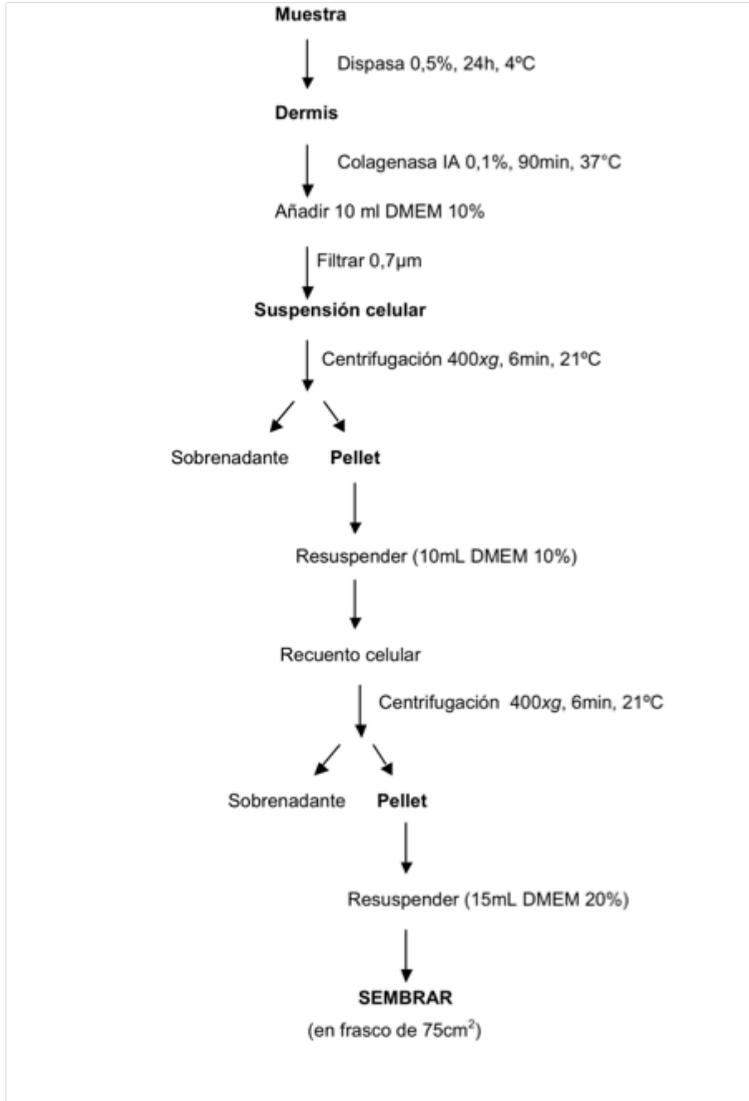


Figura 19. Protocolo de aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos.

Transcurrido este tiempo, se añaden 10 ml de medio DMEM, suplementado con penicilina, estreptomina y 10% de suero bovino fetal (SBF) (Biowest, Nualillé, Francia), y se filtra la suspensión con tamiz celular de 0,7  $\mu\text{m}$ .

El filtrado se centrifuga a 400xg durante 6min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se resuspende de nuevo en 10 ml de DMEM al 10% de SBF y se procede al recuento celular en un contador Beckman Coulter™ (Beckman Coulter, EEUU).

Tras una centrifugación final en las condiciones citadas anteriores, el precipitado se resuspende en DMEM suplementado con 20% de SBF, penicilina, estreptomina y 20  $\mu\text{g/ml}$  de nistatina, en una proporción de 1 a 3 millones de células por 15 ml que se siembra en frascos de 75  $\text{cm}^2$  (ocasionalmente sembramos menor cantidad de fibroblastos psoriásicos ya que partimos de muestras de tamaño muy reducido).

Los cultivos se mantienen a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  durante dos días para favorecer la adhesión de los fibroblastos y, posteriormente, se realiza un cambio de medio para eliminar las células no adheridas, empleando a partir de este momento DMEM al 10% SBF con penicilina y estreptomina. El mantenimiento del cultivo celular se realiza mediante cambios de medio cada dos días hasta que las células forman una monocapa con tendencia a la confluencia.

Los pases o subcultivos se realizan cuando las células han alcanzado un 70-90% de confluencia. Para ello, se retira el medio de cultivo y tras un lavado con 10 ml de PBS estéril se añaden 4 ml de una solución de tripsina 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) durante 4min. Seguidamente, se añaden 8 ml de DMEM 10% SBF para neutralizar el efecto de la tripsina. Las células en suspensión se recogen por aspiración y se centrifugan a 400xg durante 6min. Finalmente, las células son resuspendidas en medio fresco y son sembradas en placas o microcámaras ajustando la concentración celular a la requerida para cada ensayo.

## 2.2. Estímulos, productos y condiciones de experimentación

### Estímulos y productos:

- TNF $\alpha$  (R&D Systems, Abingdon, RU), disuelta en PBS estéril. Concentraciones empleadas: 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml.
- TPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU), disuelto en etanol. Concentración empleada: 1  $\mu$ g/ml.
- IL-1 $\beta$  (Peprotech, Rocky Hill, EEUU), disuelta en medio de cultivo DMEM. Concentración empleada: 2,5 ng/ml.
- IL-6 (R&D Systems, Abingdon, RU), disuelta en PBS estéril. Concentración empleada: 50ng/ml.
- PD98059 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU): Inhibidor de ERK1/2, disuelto en etanol. Concentración empleada: 50  $\mu$ M.
- SB202190 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU): Inhibidor de p38, disuelto en etanol. Concentración empleada: 50  $\mu$ M.
- SP600125 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU): Inhibidor de SAPK/JNK, disuelto en etanol. Concentraciones empleadas: 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M.

### Condiciones de experimentación:

- 50.000 cél/pocillo en placas de 24 pocillos. Sobre ellas se realizaron el ensayo de viabilidad celular MTT y la determinación de los niveles de PGE $_2$ , IL-8 e IL-6 liberados 24h después de ser estimuladas, así como el ensayo de tiempo-dependencia en los que se determinaron las concentraciones de IL-8 e IL-6 liberadas a distintos tiempos.
- 25.000 cél/pocillo en microcámaras de tipo Chamber Slide™ de 8 pocillos (Nunc International, New York, EEUU). Se realizaron las técnicas de inmunofluorescencia (detección de vimentina) e inmunocitoquímica de COX-2.
- 300.000 cél/pocillo en placas de 6 pocillos. Se estudió la expresión de COX-2 y RelB por Western Blot.

- 500.000 cél/pocillo en placas de Petri de 60 mm. Se estudiaron las vías de señalización y la expresión de ARNm de COX-2, COX-1 y GAPDH, así como de miR-146a y ARNs de U6 por RT-PCR a tiempo real.

En los ensayos realizados en placas de 24 pocillos y microcámaras de 8 pocillos Chamber Slide™, las células se sembraron a las densidades citadas y, 24h después de la siembra, se procedió con el experimento correspondiente.

En los estudios llevados a cabo en las placas de 6 pocillos y placas Petri de 60 mm, las células se mantuvieron en cultivo en las placas hasta que alcanzaron el 70-80% del nivel de confluencia, momento en el cual se realizaron los experimentos correspondientes.

Para el estudio de la activación a 15 y 30min de las vías de señalización, las células se mantuvieron 6h en ausencia de SBF (condiciones de “starving”) con la finalidad de sincronizarlas. La estimulación también se realizó en estas condiciones.

Todos los estímulos estudiados han sido comparados con un grupo control de células no estimuladas incluido en los diversos ensayos realizados.

### **2.3. Expresión de vimentina por inmunofluorescencia**

La confirmación del fenotipo fibroblástico se lleva a cabo mediante la detección de vimentina por inmunofluorescencia. El fundamento de esta técnica es similar al descrito para la inmunohistoquímica, con la salvedad de que en la inmunofluorescencia, el anticuerpo secundario está marcado con un fluorocromo. Estas sustancias fluorescentes son moléculas que emiten luz visible cuando son iluminadas con una determinada longitud de onda y que, por tanto, podrán ser observadas a través de un microscopio de fluorescencia.

### Protocolo experimental

Los fibroblastos son sembrados en microcámaras de tipo Chamber Slide™ de 8 pocillos con DMEM suplementado con 10% SBF, penicilina y estreptomycin. Transcurridas 24h, las células son fijadas con metanol durante 15min en frío. Seguidamente, se lleva a cabo el bloqueo de las uniones inespecíficas con BSA al 1% en PBS durante 30min y se incuba el anticuerpo primario (1:100) (Millipore, California, EEUU) durante 2h a temperatura ambiente. A continuación, y siempre realizando 3 lavados con PBS entre paso y paso, se incuba 1h el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 (1:500) (Invitrogen, Carlsbad, EEUU), se monta con una solución DAPI (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) y se realizan las fotos utilizando el microscopio Leica DM IL LED (Solms, Alemania) y adquiridas con una cámara digital Leica DFC425 C, mediante el programa Leica Application Suite. Posteriormente, las imágenes son montadas utilizando ImageJ software.

### **2.4. Ensayo de viabilidad celular**

El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniletiazolio) es un método colorimétrico que permite determinar la viabilidad celular.

Este ensayo se ha realizado para evaluar la posible citotoxicidad o variación de la proliferación celular de los estímulos en estudio. La técnica se basa en la capacidad celular de reducir el MTT a formazán por acción del enzima succinildeshidrogenasa mitocondrial, reacción que requiere NADH. Este enzima, presente en las células sobre las que se lleva a cabo directamente la reacción, es indicativo de un buen funcionamiento celular (Borenfreund y *cols.*, 1988). La sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo, pasa a un color púrpura cuando es reducida a formazán. La cantidad de formazán se cuantifica por colorimetría a 490 nm.

### Protocolo experimental:

Una vez retirado el sobrenadante y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se añade 300  $\mu\text{l}$  de la solución de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) (concentración final de 0,5 mg/ml) sobre las células que quedan adheridas al pocillo. Tras incubar durante 60min a  $37^{\circ}\text{C}$ , se elimina el sobrenadante, se añade 200  $\mu\text{l}$  de DMSO para producir la lisis celular y disolver el formazán, y se determina la absorbancia a 490nm en un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR2™ (PerkinElmer, Finlandia). Los resultados se expresan en unidades de absorbancia a la longitud de onda citada. El valor de absorbancia observado es directamente proporcional al número de células viables.

### **2.5. Determinación de IL-6 e IL-8 por ELISA**

Esta técnica se ha empleado para determinar los niveles de IL-8 e IL-6 en los sobrenadantes de los fibroblastos estimulados.

El fundamento y el protocolo experimental general de esta técnica se encuentra detallado anteriormente (apartado 1.5.3.).

Los ELISAs realizados para la determinación de las citocinas IL-8 e IL-6 se han llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación de IL-6 se ha realizado mediante el kit proporcionado por Bender MedSystems® (Austria, Europa) y la determinación de IL-8 mediante ELISA Ready-SET de eBioscience (San Diego, EEUU).

### **2.6. Determinación de la producción de $\text{PGE}_2$ por radioinmunoanálisis**

Los niveles de  $\text{PGE}_2$  en los sobrenadantes de los cultivos celulares se han determinado empleando la técnica de detección de  $\text{PGE}_2$  por RIA en una muestra biológica (Moroney y cols., 1988). El fundamento y el protocolo experimental general se encuentra detallado anteriormente (apartado 1.5.2.) utilizando el sustrato radioactivo siguiente:

<sup>3</sup>H-PGE<sub>2</sub>: [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, (n)-<sup>3</sup>H] Prostaglandin E2 (Amersham International, Reino Unido).

## **2.7. Detección de la expresión de COX-2 por inmunocitoquímica**

El fundamento de esta técnica es similar al descrito para la inmunohistoquímica (apartado 1.5.5.).

### Protocolo experimental:

Los fibroblastos sembrados en Chamber Slide™ de 8 pocillos son estimulados con TPA o IL-1β. Transcurridas 24h, se eliminan los sobrenadantes y tras lavar las células con PBS frío, se fijan con paraformaldehído al 4% durante 15min. Tras realizar varios lavados con PBS/Tween 0,1%, se incuban durante 10min con una solución bloqueante de peroxidasas (Dako, Copenhagen, Dinamarca) para inactivar la actividad peroxidasa endógena de nuestras células. Trascurrido este tiempo, se bloquean las uniones inespecíficas con suero bovino fetal en PBS/Tween (1:10) durante 15min.

Después de realizar varios lavados, las células son incubadas 2h con anticuerpo primario de COX-2 (Dilución 1:500) (Millipore, California, EEUU), a excepción de las células utilizadas como control negativo de la inmunotinción. Trascurrido este tiempo y tras varios lavados, los fibroblastos son incubados 1h con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (HRP) (1:200) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Finalizado este periodo, se lavan las células y se añade el DAB (Vector, California, EEUU).

Finalmente se contrastan las células con una solución de hematoxilina, se montan en medio de montaje acuoso (Dako, Copenhagen, Dinamarca) y se observan las imágenes con un microscopio Nikon Eclipse E600FN, utilizando el programa Nikon ACT1 para la captura, almacenamiento y procesamiento de las imágenes.

### **2.8. Análisis de la expresión de COX-2 y estudio de la señalización celular por Western Blot**

El fundamento de esta técnica ya ha sido descrito anteriormente (apartado 1.5.4.).

La expresión de COX-2 se estudió 24h después de los estímulos. La activación de las vías de señalización se examinó a los 15 o 30min dependiendo del objetivo de estudio, mientras que la subunidad RelB del complejo transcripcional NF- $\kappa$ B fue analizada 6h después de adicionar los estímulos.

#### Protocolo experimental:

Las células procedentes de placas de 6 pocillos y placas Petri de 60 mm, se lavan con 1 ml de PBS a pH 7,4 frío y se rascan con 80-120  $\mu$ l de tampón de lisis Ripa (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% de deoxicolato sódico) frío en presencia de un cóctel de inhibidor de proteasas (1 mM DTT, 5 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 0,1  $\mu$ g/ml aprotinina, 0,5 mM PMSF). Las células se lisan durante 15min en hielo, se centrifugan a 10.000xg durante 1min y se recoge el sobrenadante (lisado celular total). La concentración de proteínas contenidas en el lisado celular se cuantifica por el método Bradford-DC (kit Bio Rad DC Protein Assay, Bio Rad Laboratories, California, USA).

Se resuspenden 15  $\mu$ g de proteína procedente del lisado celular en el tampón de carga reductor o Laemmli y se realiza la técnica del Western Blot tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 1.5.4.).

Para la expresión de COX-2, el anticuerpo empleado es el mismo utilizado en inmunocitoquímica (Millipore, California, EEUU). Aquí, la dilución realizada es de 1:8000.

Los anticuerpos utilizados para el estudio de las vías de señalización provienen de Cell Signaling Technology, Beverly, EEUU: Subunidad p65 fosforilada (Ser536) de NFκB, p38 fosforilada (Thr180/Tyr182), ERK1/2 fosforiladas (Thr202/Tyr204), CREB fosforilada (Ser133), SAPK/JNK fosforiladas (Thr183/Tyr185), SAPK/JNK, STAT3 fosforilada (Ser727), STAT3 fosforilada (Tyr705), subunidad RelB del NF-κB. Para todos ellos, la dilución realizada es de 1:1000.

Asimismo, el anticuerpo secundario empleado es anti-conejo acoplado a peroxidasa (HRP) (dilución 1:5000) (Dako, Glostrup, Dinamarca).

### **2.9. RT-PCR a tiempo real**

Se trata de un método que permite analizar la expresión de un determinado gen. Es una variante de la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa reversa) convencional que permite cuantificar la cantidad de copias de ARN mensajero (ARNm) presentes en la muestra correspondiente a un gen determinado.

Utilizando como molde el ARNm extraído de las células, se sintetiza una doble cadena de ADN complementario (ADNc) por acción de la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, una secuencia específica del ADN de doble cadena es amplificada por PCR convencional en presencia de una molécula fluorogénica que, al intercalarse en la doble cadena de ADN, va a emitir fluorescencia en un termociclador, acoplado a un sistema que capta y cuantifica las señales emitidas y nos permite conocer el producto de la PCR en tiempo real.

#### Procedimiento experimental:

Los fibroblastos son sembrados en placas de 60 mm. Tras ser estimulados, se realiza la extracción del ARN a diferentes tiempos. Para ello, lavamos las placas con PBS estéril frío y añadimos 1 ml de Tripure<sup>®</sup> (Roche Applied Science, Indianápolis, EEUU) por placa en hielo. El Tripure<sup>®</sup> es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que disuelve

los componentes celulares manteniendo la integridad del ARN durante la lisis celular. A continuación, se raspa la superficie de la placa y los extractos se transfieren a tubos eppendorfs donde se va a añadir 200 µl de cloroformo a cada uno. Se agita vigorosamente durante 5min y tras centrifugar a 12000xg y 4°C durante 15min se obtiene una separación de fases, una fase orgánica inferior de fenol y cloroformo que contiene las proteínas, una interfase que contiene el ADN y una fase acuosa superior que contiene el ARN.

Se recoge cuidadosamente la fase acuosa y se transfiere a otro eppendorf donde se añaden 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN. Se centrifugan a 12000xg durante 10min a 4°C, se elimina el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 70% a cada eppendorf. Se vuelve a centrifugar (7600xg, 4°C durante 5min), se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 20 µl de agua libre de ARNasas y se incuba a 60°C durante 10min para evaporar el alcohol. Una vez aislado el ARN, se procede a la cuantificación de su concentración por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260/280 nm.

La transcripción reversa para la síntesis de ADNc se realizó utilizando un kit que contiene un inhibidor de ribonucleasas, desoxirribonucleótidos (dNTPs) que constituyen la materia prima a partir de la cual la enzima construirá la cadena de complementaria, un cebador oligo d(T) que se une a la cola PoliA del ARNm y permite la elongación del ADNc y la transcriptasa reversa que en nuevos eppendorfs se mezcla con un volumen fijo de cada muestra y agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 5 µl. A continuación, se somete a un ciclo de hibridación a 70°C durante 5min y a un ciclo de 42°C durante 60min en los cuales ocurre la reacción de extensión. Por último, se inactiva la enzima elevando la temperatura a 70°C durante 15min y se obtiene el ADNc sintetizado.

El ADNc de miR-146a y u6 es obtenido mediante un kit de transcripción reversa especial para microRNA (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), utilizando primers específicos.

Un fragmento específico de la cadena complementaria del ADN sintetizada se amplifica mediante PCR convencional. Esta reacción contiene un ADN polimerasa termoestable para elongar el molde y producir la amplificación, cebadores con secuencias complementarias al fragmento de ADN que se va a amplificar, desoxirribonucleótidos, una sonda TaqMan complementaria a una parte de la secuencia a amplificar marcada con un fluorocromo, tampón para PCR y la muestra de ADNc sintetizada por RT.

La mezcla de la muestra de ADNc con las sondas y cebadores junto con el TaqMan Master Mix se somete a diferentes cambios de temperatura de forma cíclica en un termociclador espectrofluorométrico StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) dando comienzo la reacción en cadena de la polimerasa. Cada ciclo se divide en tres etapas: desnaturalización, donde se separan las cadenas de ADN; alineamiento donde los cebadores se hibridan en sentido y antisentido con las secuencias complementarias del fragmento a amplificar, y extensión, donde por acción de la ADN polimerasa se sintetizan nuevas cadenas de ADN complementario a la cadena molde.

Las condiciones concretas para la PCR fueron: 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos en dos pasos: Desnaturalización a 95°C durante 15seg, Hibridación y extensión a 60°C durante 1min. La fluorescencia se midió continuamente.

El número de copias del correspondiente producto de la PCR o “amplicón” se cuantificó conociendo su ciclo umbral ( $C_T$ ). El  $C_T$  de una muestra es el ciclo en el que su intensidad de fluorescencia sobrepasa un umbral preestablecido. De manera que, cuanto antes alcance este umbral, menor será su valor  $C_T$ , mayor su intensidad de fluorescencia y mayor la expresión relativa de la muestra analizada.  $\Delta C_T$  representa la diferencia entre el  $C_T$  de un gen o microARN estudiado y el  $C_T$  de un gen o ARNsn de referencia para la misma muestra. Como nuestro objetivo era observar las diferencias de expresión entre distintos genes y microARN existentes en fibroblastos sanos y psoriásicos en determinadas condiciones, los

resultados se expresaron como  $2^{-\Delta CT}$ , que representa la expresión relativa de un determinado gen o microRNA de estudio respecto su gen o ARNs de referencia en fibroblasto sano o fibroblasto psoriásico para cada tratamiento empleado.

Los niveles de expresión del ADNc detectados se analizaron mediante StepOnePlus software y fueron normalizados con los niveles detectados del ADNc de referencia GAPDH (para COX-1, COX-2) o U6 (para miR146a).

### 3. Análisis estadístico y expresión de los resultados

Los resultados se han presentado como media aritmética de los valores  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n$  representa el número de animales utilizado por grupo (trabajo *in vivo*) o el número de muestras empleadas (*in vitro*). Los resultados obtenidos se sometieron a distintos tratamientos estadísticos en función de los datos analizados mediante el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, EEUU).

1. *In vivo*: Para comparar distintos grupos experimentales con respecto a un grupo control, los resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico empleado el método one-way ANOVA y la  $t$  de Dunnett para comparaciones múltiples. El método de Dunnett permite comparar los valores medios obtenidos para varios grupos problema respecto a un único grupo control en un mismo experimento, teniendo en cuenta el error asociado a las comparaciones múltiples. Se considera que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control es significativo,  $*p < 0,05$ , cuando el valor  $t$  obtenido es mayor que el tabulado para un margen de confianza del 95% y muy significativo,  $**p < 0,01$  y  $***p < 0,001$ , cuando es mayor del 99% y 99,9% respectivamente. Se utilizó el símbolo (\*) para representar la significatividad estadística respecto al grupo B (grupo tratado únicamente con el vehículo), y el símbolo (#) para la comparación respecto al grupo C (grupo únicamente tratado con TPA). La ausencia de símbolo indica que no hubo diferencias significativas respecto al grupo control correspondiente.
2. *In vitro*: Como trabajamos con dos poblaciones celulares distintas, sanas y psoriásicas, empleamos el método two-way ANOVA y el test de Sidak para comparaciones múltiples. Este test nos permite comparar entre distintas poblaciones y distintos tratamientos. Se utilizó el símbolo (\*) para representar la significatividad estadística de los fibroblastos sanos tratados respecto a los fibroblastos sanos

no tratados (B), el símbolo (#) para la comparación de los fibroblastos psoriásicos tratados respecto a los fibroblastos psoriásicos no tratados (B), y el símbolo (+) en la comparación entre los fibroblastos sanos y los fibroblastos psoriásicos sujetos a condiciones similares (mismo tratamiento). La ausencia de símbolo indica que no hubo diferencias significativas respecto al grupo control correspondiente. En el caso en que la diferencia respecto al grupo control correspondiente no resultara significativa no se empleó ningún símbolo indicativo. En los ensayos en los que únicamente se ha experimentado con una población celular (fibroblastos sanos), el método estadístico empleado ha sido el one-way ANOVA y el test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los símbolos utilizados han sido (\*) para comparar con el grupo no tratado (B) y (#) para comparar los distintos tratamientos ensayados con el grupo control tratado (C).

Nota: Todos los materiales y reactivos empleados en la presente Tesis Doctoral que no han sido especificados han sido adquiridos de Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU.

# RESULTADOS

---



# RESULTADOS

---

## **PARTE I:** ESTUDIO DEL EFECTO DE CGS-21680 EN EL MODELO DE HIPERPLASIA EN PIEL DE RATÓN INDUCIDA POR TPA



## **1. Estudio del efecto de CGS-21680 en el modelo de hiperplasia en piel de ratón inducida por TPA**

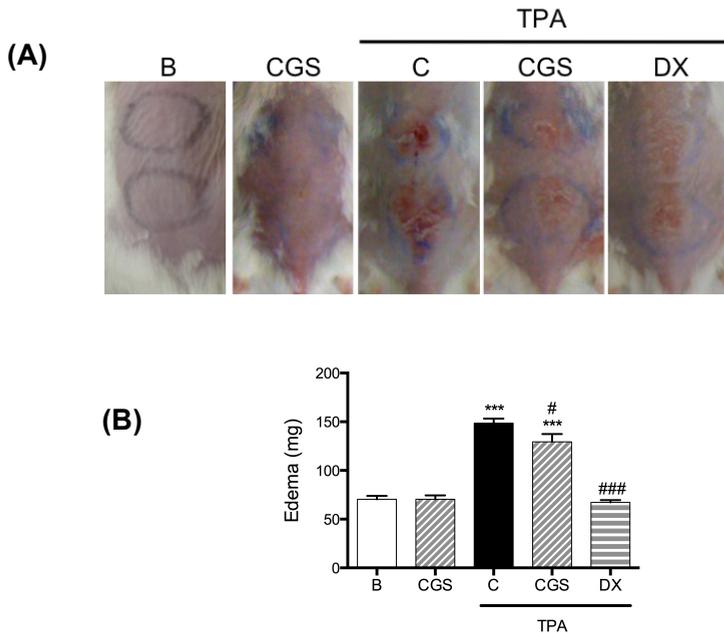
Empleando el modelo de hiperplasia en piel de ratón, el cual reproduce algunos de los parámetros histopatológicos característicos de la piel psoriásica, hemos determinado el efecto de un agonista selectivo del receptor  $A_{2A}$  de adenosina, CGS-21680, tras su aplicación por vía tópica. La dosis de CGS-21680 utilizada en este estudio (5  $\mu$ g/sitio) fue escogida tomando como referencia diversos artículos en los que esta dosis fue efectiva para promover la curación de heridas cutáneas en ratones normales, así como en ratas diabéticas que presentaban un retraso en la curación (Montesinos y cols., 1997; Montesinos y cols., 2002; Victor-Vega y cols., 2002). Se han empleado 5 grupos de 6-8 animales cada uno en los que se han estudiado diferentes características y parámetros inflamatorios, usando como referencia el antiinflamatorio dexametasona (200  $\mu$ g/sitio). Ambos compuestos han sido administrados vía tópica durante tres días consecutivos, 30min antes de la aplicación del agente irritante TPA (2 nmol/sitio) o el vehículo, en el caso del grupo blanco de CGS-21680.

### **1.1. Efecto de CGS-21680 sobre la lesión cutánea y el edema inducidos por TPA**

En la Figura 20A, se observa como la administración tanto de CGS-21680 como de dexametasona sobre la piel de los ratones tratados con TPA, disminuye la aparición de las lesiones cutáneas inducidas por el agente irritante.

## RESULTADOS

La formación de edema se analizó por determinación del peso de las biopsias extraídas mediante un sacabocados. La reducción del edema observada en los ratones tratados con CGS-21680 fue muy moderada aunque significativa. En cambio, la dexametasona inhibió completamente la formación de edema, obteniendo valores similares al grupo de blancos, cuya piel fue tratada únicamente con el vehículo, y al grupo de blancos de CGS-21680 (Figura 20B).

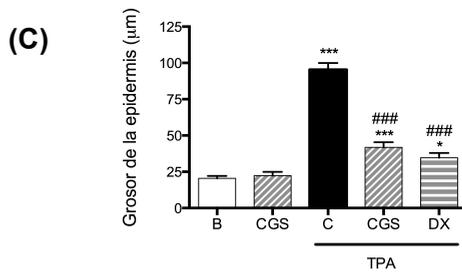
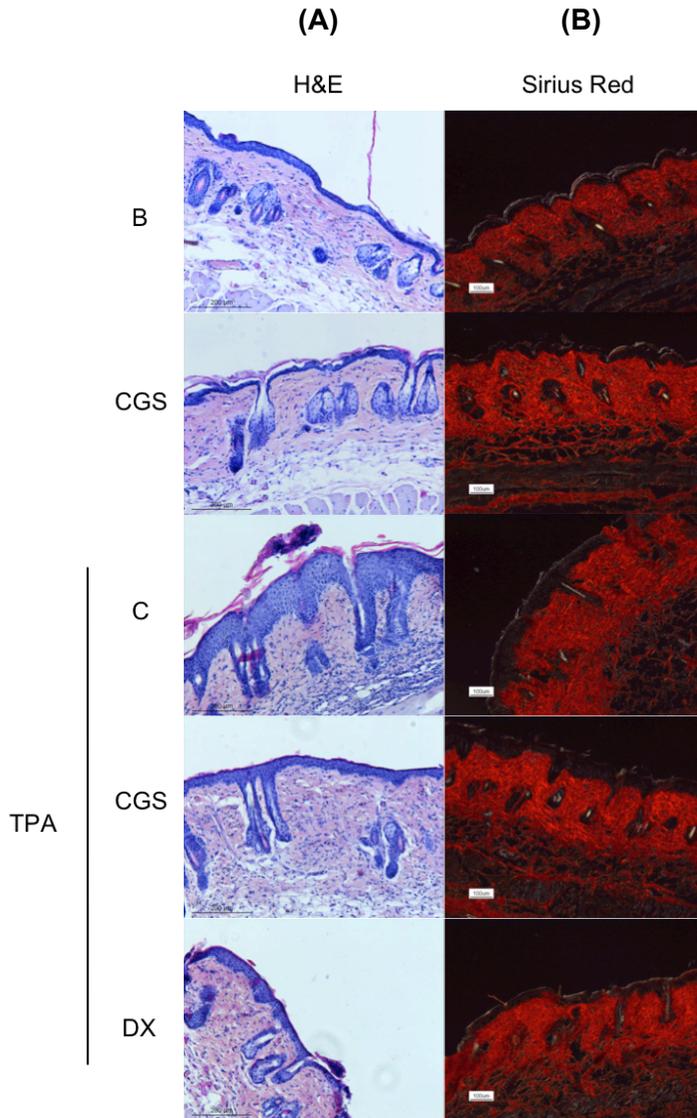


**Figura 20.** Efecto de CGS-21680 sobre la formación de lesiones (A) y edema (B) en el modelo de hiperplasia en piel de ratón. Resultados expresados como media  $\pm$  SEM ( $n=6-8$  animales).  $t$  de Dunnett \*\*\* $p < 0,001$  respecto B; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ , respecto C. B: ratones tratados con el vehículo (acetona 0,1% DMSO) (Blancos). CGS: CGS-21680 5  $\mu\text{g/sitio}$  30min previa a la aplicación de TPA o vehículo. C: tratados con TPA 2 nmol/sitio. DX: dexametasona 200  $\mu\text{g/sitio}$  30min previa a la aplicación de TPA.

## 1.2. Estudio histopatológico del efecto de CGS-21680

En el estudio histopatológico de las secciones de piel realizado mediante tinción con eosina-hematoxilina (H&E), observamos que la aplicación de TPA durante tres días consecutivos produce un incremento del grosor de la epidermis conocido como hiperplasia epidérmica (Figura 21A y 21C), aumentando tanto el número de células como el área de las invaginaciones epidérmicas características de la acantosis psoriasiforme, respecto a los ratones tratados únicamente con el vehículo. En la dermis procedente de piel estimulada con TPA se observa un aumento de la infiltración leucocitaria, así como una marcada extravasación de células eritrocíticas. Además es evidente una mayor deposición de proteínas extracelulares de matriz con aspecto desorganizado.

La aplicación previa del agonista CGS-21680 tiene un marcado efecto beneficioso. Así pues, en los cortes histológicos de piel tratada con CGS-21680 se observa una reducción muy significativa de la hiperplasia epidérmica (Figura 21A y 21C) y una evidente normalización de la dermis, que presenta menor infiltración leucocitaria y una disposición más organizada de las fibras conectivas. Así, observamos un incremento notable de las fibras de colágeno visualizadas mediante la tinción con el método Sirius Red (Figura 21B). Tanto el grupo tratado con CGS-21680, como el grupo blanco de CGS-21680 muestran una compactación mayor de estas fibras en la dermis. En este sentido, ha sido descrito que la activación de receptores  $A_{2A}$  de la adenosina promueve la síntesis de colágeno de tipo 1 y 3 por los fibroblastos dérmicos humanos (Chan *y cols.*, 2013; Perez-Aso *y cols.*, 2014).



Es de señalar que este incremento en la compactación de las fibras de la dermis tras la aplicación de CGS-21680, podría dar lugar a un aumento en el peso de las biopsias, e interferir por lo tanto en el resultado de la determinación del edema, justificando por lo tanto el efecto tan moderado obtenido a este nivel.

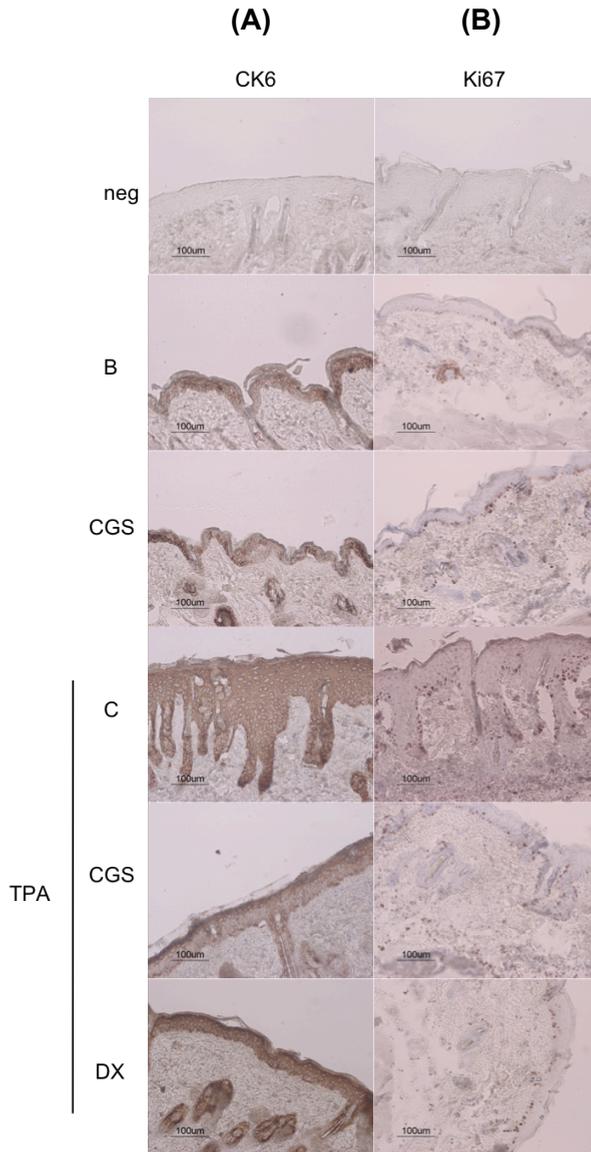
El tratamiento con el agente antiinflamatorio de referencia dexametasona produjo la normalización de los diferentes parámetros estudiados, así como una marcada disminución del grosor de la piel (Figura 21A, 21B y 21C).

### 1.3. Efecto del CGS-21680 sobre la proliferación celular

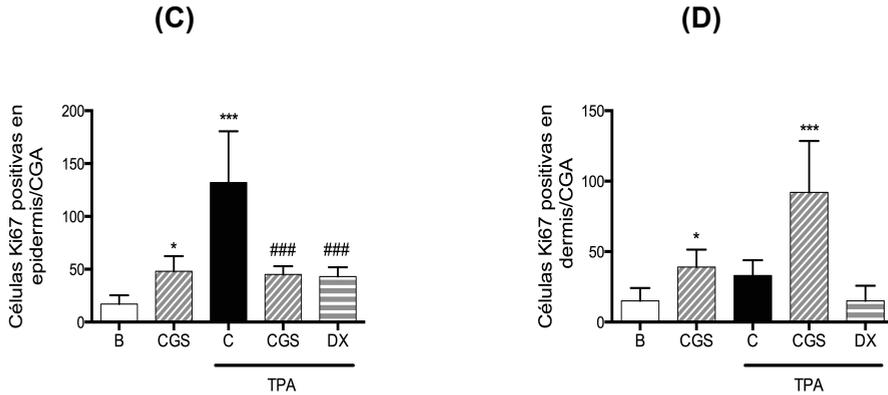
Para caracterizar mejor el efecto del CGS-21680 sobre la hiperplasia epidérmica, se analizaron por inmunohistoquímica dos marcadores de proliferación: la CK6 (Figura 22A), característica de los queratinocitos hiperproliferativos, y el Ki67 (Figura 22B), un antígeno nuclear expresado en células en proliferación.

Como podemos observar, la aplicación repetida de TPA produce un aumento de la síntesis de CK6 en la epidermis así como un incremento de queratinocitos en proliferación marcado por el anticuerpo de Ki67 (Figura 22A, 22B y 22C). Tal y como se muestra en la figura 22, tanto el CGS-21680 como el inhibidor de referencia dexametasona, reducen pronunciadamente la expresión de esta citoqueratina (Figura 22A) y el número de queratinocitos proliferativos (Figura 22B y 22C), preservando, de esta manera, la estructura natural de la epidermis.

◀ **Figura 21 (página anterior).** Estudio histopatológico del efecto de CGS-21680. **(A)** Fotomicrografías de las secciones teñidas con eosina-hematoxilina. **(B)** Imágenes representativas de la tinción Sirius Red para colágeno obtenidas usando luz polarizada. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . **(C)** Medida del grosor de la epidermis en las secciones teñidas con eosina-hematoxilina. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (n=6-8). \*\*\* $p < 0,001$  respecto B, # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  respecto C. B: grupo tratado con el vehículo, C: tratados con TPA, CGS: tratados con CGS-21680, DX: tratados con dexametasona.



**Figura 22 A-B.** Efecto de CGS-21680 sobre la proliferación celular. **(A)** Detección mediante inmunohistoquímica de la citoqueratina 6 (CK6) en secciones de tejido, marcado en marrón. Barra: 100  $\mu$ m. **(B)** Detección mediante inmunohistoquímica de Ki67 en secciones de tejido, marcado en marrón. Barra: 200  $\mu$ m neg: control negativo (sin el anticuerpo primario correspondiente en cada caso).



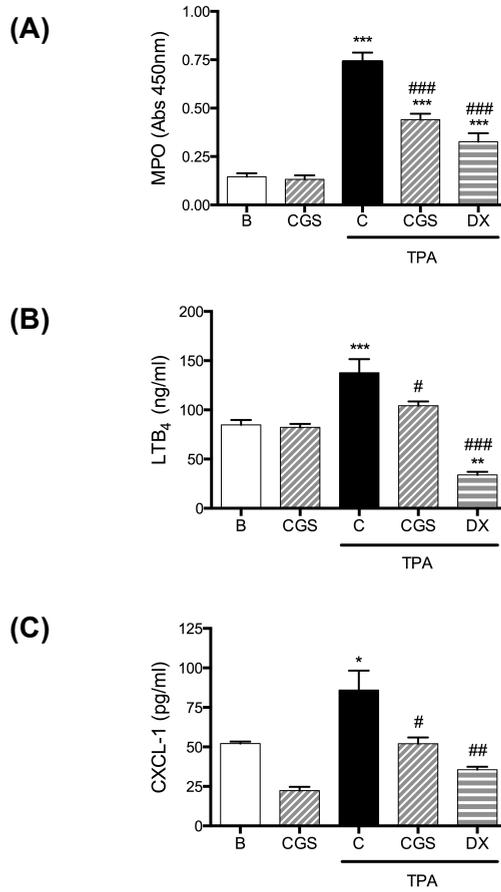
**Figura 22 C-D.** Efecto de CGS-21680 sobre la proliferación celular. **(C)** Número de células Ki67 positivas en la epidermis por campo de gran aumento (CGA). **(D)** Número de células Ki67 positivas en la dermis por CGA (400x). Cinco campos por sección fueron analizados y promediados, los datos representan la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto B, ### $p < 0,001$  respecto C. B: grupo tratado con el vehículo, C: tratados con TPA, CGS: tratados con CGS-21680, DX: tratados con dexametasona, neg: control negativo (sin el anticuerpo primario correspondiente en cada caso).

Sorprendentemente, el tratamiento con CGS-21680 provocó un incremento en la proliferación de los fibroblastos en la dermis, tanto en el grupo estimulado con TPA, como en el grupo blanco de CGS-21680, lo que podría contribuir fomentando todavía más la síntesis de colágeno por este tipo celular (Figura 22D).

#### 1.4. Efecto de CGS-21680 sobre diversos mediadores quimioatrayentes

Al observar la inhibición del infiltrado celular en las secciones teñidas con H&E, decidimos estudiar algunos de los principales parámetros implicados en la infiltración celular en el modelo de hiperplasia epidérmica inducida por TPA. Para ello, se analizaron los homogenados de las biopsias con el fin de determinar la actividad MPO (Figura 23A), como un marcador de la infiltración leucocitaria. Paralelamente se determinaron los niveles del

eicosanoide quimioatrayente LTB<sub>4</sub> (Figura 23B) y de la quimiocina CXCL-1 (Figura 23C), el análogo funcional en ratón de la IL-8 humana.

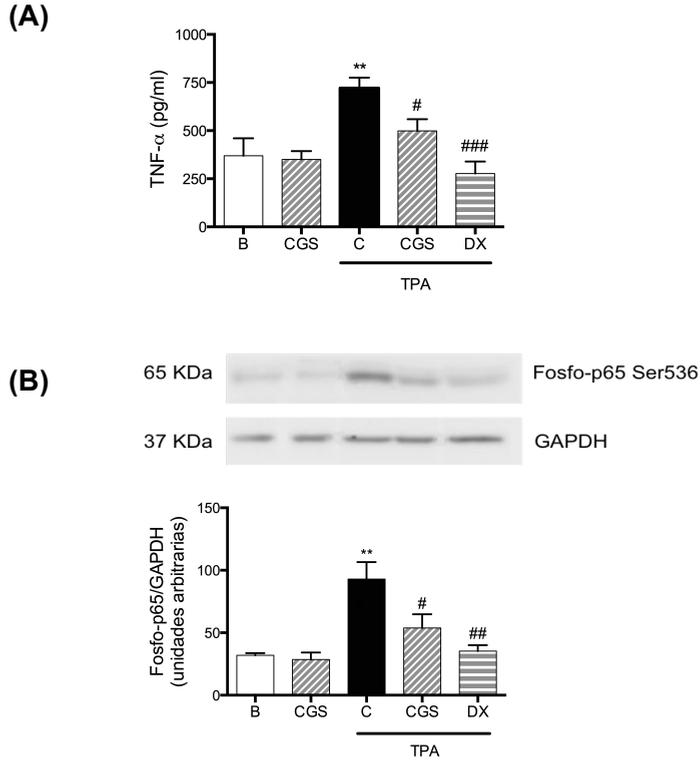


**Figura 23.** Efecto de CGS-21680 sobre la actividad MPO (A) y los niveles de LTB<sub>4</sub> (B) y CXCL-1 (C) en los homogenados de las biopsias. Resultados expresados como media  $\pm$  SEM (n= 6-8 animales). *t* de Dunnett \**p* <0,05, \*\**p* <0,01, \*\*\**p* <0,001 respecto B, #*p* <0,05, ##*p* <0,01, ###*p* <0,001 respecto C. B: grupo tratado con el vehículo, C: tratados con TPA, CGS: tratados con CGS-21680, DX: tratados con dexametasona.

Como se observa en la Figura 23A, el CGS-21680 reduce de manera muy significativa la actividad MPO, enzima que como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos, es característica de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, Este efecto es similar al obtenido con el tratamiento de referencia dexametasona 200 µg/sitio. Además, CGS-21680 produce una reducción significativa de los factores quimiotácticos LTB<sub>4</sub> y CXCL-1 (Figura 23B y 23C, respectivamente). Es interesante destacar que el CGS-21680 fue capaz de reducir los niveles de CXCL-1 incluso en el grupo blanco de este compuesto aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. Este hallazgo sugiere que el CGS-21680 podría contribuir en la regulación de la epitelización y el remodelado tisular en piel sana, funciones en parte mediadas por la CXCL-1 constitutivamente expresada por células residentes de la piel, como queratinocitos y células endoteliales (Zaja-Milatovic y Richmond, 2008).

### **1.5. Efecto de CGS-21680 sobre la activación de NF-κB y la liberación de TNFα**

Es sabido que la sobre-expresión de quimiciocinas, como CXCL-1, en la piel está mediada por la activación del NF-κB (Tak y Firestein, 2001; Riis y *cols.*, 2011). Este factor nuclear es crucial para la respuesta inmunoinflamatoria implicada en distintas enfermedades cutáneas, induciendo la expresión de otras citocinas como el TNFα, el cual a su vez también activa la vía del NF-κB, lo que resulta en una retroalimentación inflamatoria positiva (Quivy y Van Lint, 2004; Perera y *cols.*, 2012). Por lo tanto, después de establecer el efecto inhibitor del CGS-21689 sobre la producción de mediadores quimioatrayentes, determinamos el nivel de TNFα en los homogenados mediante ELISA, y la activación de la vía del NF-κB por Western Blot.



**Figura 24.** Efecto de CGS-21680 sobre la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de TNF $\alpha$ . **(A)** Niveles de TNF $\alpha$  en los homogenados de piel. **(B)** Imagen representativa de la fosforilación de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B determinada mediante Western Blot y análisis de su expresión por densitometría. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM (n=6-8). *t* de Dunnett \*\**p* <0,01 respecto B, #*p* <0,05, ##*p* <0,01, ###*p* <0,001 respecto C. B: grupo tratado con el vehículo, C: tratados con TPA, CGS: tratados con CGS-21680, DX: tratados con dexametasona.

Como se muestra en la figura 24A, los niveles de TNF $\alpha$  aumentaron en los homogenados de las biopsias obtenidas de ratones tratados con TPA, mientras que la aplicación de CGS-21680 redujo significativamente la liberación de esta citocina. Consecuentemente, el tratamiento con TPA causó un marcado incremento de la fosforilación de la subunidad p65 del complejo transcripcional NF- $\kappa$ B (Figura 24B), el cual fue claramente inhibido por la aplicación de CGS-21680. Efectos similares fueron observados tras la aplicación del agente de referencia dexametasona. Por tanto, nuestros

resultados confirman aún más el efecto antiinflamatorio del agonista de los receptores  $A_{2A}$  de la adenosina CGS-21680 observados en otros modelos in vivo, como la artritis inducida por colágeno tipo II en ratón (CIA) (Mazzon y cols., 2011) y la artritis inducida por adyuvante en ratas (Vincenzi y cols., 2013).



# RESULTADOS

---

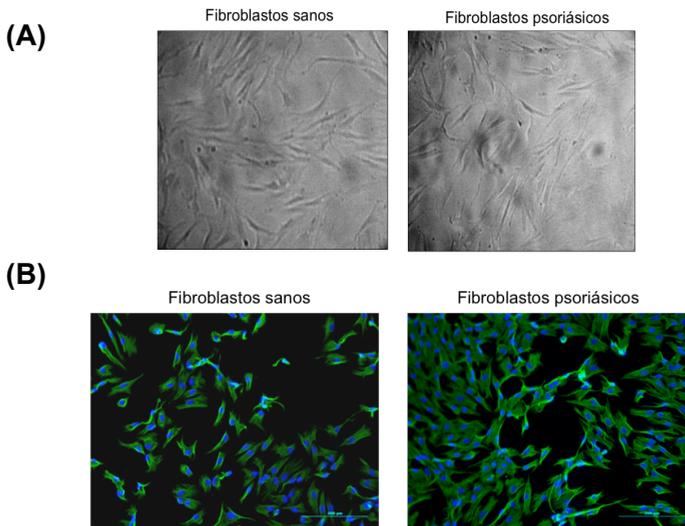
## **PARTE II: MEDIADORES INFLAMATORIOS EN FIBROBLASTOS SANOS Y PSORIÁSICOS**



## 2. Mediadores inflamatorios en fibroblastos sanos y psoriásicos

### 2.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de los fibroblastos dérmicos

Una vez realizado el aislamiento y siembra de los fibroblastos, tal y como se ha detallado en el correspondiente capítulo de material y métodos, se ha conseguido un cultivo homogéneo de este tipo celular que alcanza el 90-95% de confluencia aproximadamente en 7 días. Los fibroblastos psoriásicos necesitan más tiempo al disponer de una muestra de tamaño inferior.



**Figura 25.** Cultivo primario y caracterización de fibroblastos dérmicos humanos. **(A)** Imágenes representativas de fibroblastos sanos y fibroblastos procedentes de piel psoriásica en cultivo. Amplificación 20x **(B)** Detección mediante inmunofluorescencia de vimentina (en verde); los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul). Barra: 200  $\mu$ m. Las micrografías fluorescentes son representativas de 3 experimentos.

Morfológicamente no se observan diferencias apreciables entre los fibroblastos procedentes de donantes sanos (FS) y de pacientes psoriásicos (FP). Ambos presentan apariencia estriada, agrupándose formando ondulaciones características conforme constituyen la monocapa de células (Figura 25A).

Como podemos observar en la figura 25B, ambos tipos de fibroblastos, al proceder del mesénquima, presentan la proteína vimentina componente principal del citoesqueleto de células mesenquimales. De esta forma, empleando un protocolo de aislamiento y cultivo para este tipo celular ampliamente estandarizado, hemos confirmado que nuestras células, procedentes tanto de muestras sanas como de psoriásicas, son fibroblastos dérmicos.

### **2.1.1. Condiciones de experimentación y estudio preliminar**

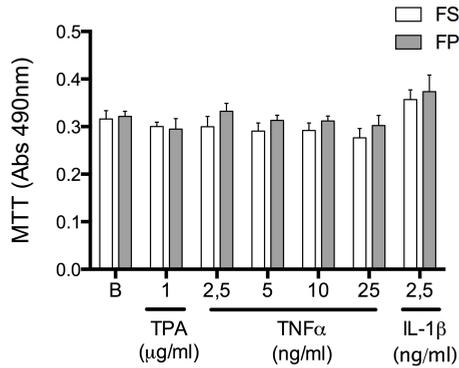
Con el fin de profundizar en el estudio de la contribución de los fibroblastos dérmicos en la patogénesis y la cronificación de la psoriasis, hemos comprobado si existen diferencias en el comportamiento de este tipo celular entre individuos sanos e individuos diagnosticados de esta patología. Para ello, hemos realizado estudios comparativos de viabilidad celular entre fibroblastos sanos y psoriásicos, determinado además la liberación de IL-6 e IL-8 (citocinas que como se ha comentado anteriormente desempeñan un importante papel en el desarrollo de la placa psoriásica) y PGE<sub>2</sub> (eicosanoide mayoritariamente producido por los fibroblastos dérmicos). Los estímulos empleados han sido TNF $\alpha$  (2,5; 5; 10, y 25 ng/ml), IL1- $\beta$  (2,5 ng/ml) y TPA (1  $\mu$ g/ml). Como es sabido, el TNF $\alpha$  es una citocina altamente implicada en la patogénesis de la psoriasis. Debido a la variedad de concentraciones de TNF $\alpha$  empleadas en los protocolos descritos en la bibliografía, hemos decidido realizar inicialmente un estudio concentración-dependiente con el fin de establecer las mejores condiciones experimentales para nuestros ensayos. La IL-1 $\beta$ , altamente secretada por queratinocitos en el proceso inflamatorio, es un potente inductor de citocinas

y COX-2 en fibroblastos (Yang y cols., 2005). La concentración utilizada de esta citocina ha sido escogida en base a referencias encontradas en la literatura relacionada (Lafuente y cols., 2008; Qian y cols., 2008). Por otra parte, se ha considerado interesante ensayar también el estímulo de TPA debido a que supone una vía de activación diferente e independiente de receptor, mediada por activación de la proteína cinasa C (PKC), ampliamente estudiada en inflamación. Además, es el agente desencadenante de la hiperplasia epidérmica utilizado *in vivo*, modelo que presenta múltiples similitudes con la lesión psoriásica (Reynolds y cols., 1997; Sato y cols., 2004).

### **2.1.2. Ensayo de viabilidad celular (MTT)**

En primer lugar, nos propusimos estudiar las posibles diferencias existentes en cuanto a la viabilidad y la proliferación entre los FS y los FP en ausencia de estímulo, así como excluir problemas de citotoxicidad tras 24h de haber sido estimulados.

Como se muestra en la figura 26, observamos que no hubieron diferencias significativas entre los valores de absorbancia correspondientes al formazán, producto obtenido de la reducción de MTT, entre FS ( $0,316 \pm 0,017$ ) y FP ( $0,321 \pm 0,11$ ) determinados tras 24h de cultivo en medio suplementado con SBF. Por tanto, podemos descartar disimilitudes en cuanto a viabilidad celular y proliferación, ya que las células son sembradas a la misma concentración (300.000 células/pocillo) y en el momento del experimento no presentan diferencias apreciables en cuanto a densidad de la monocapa celular.

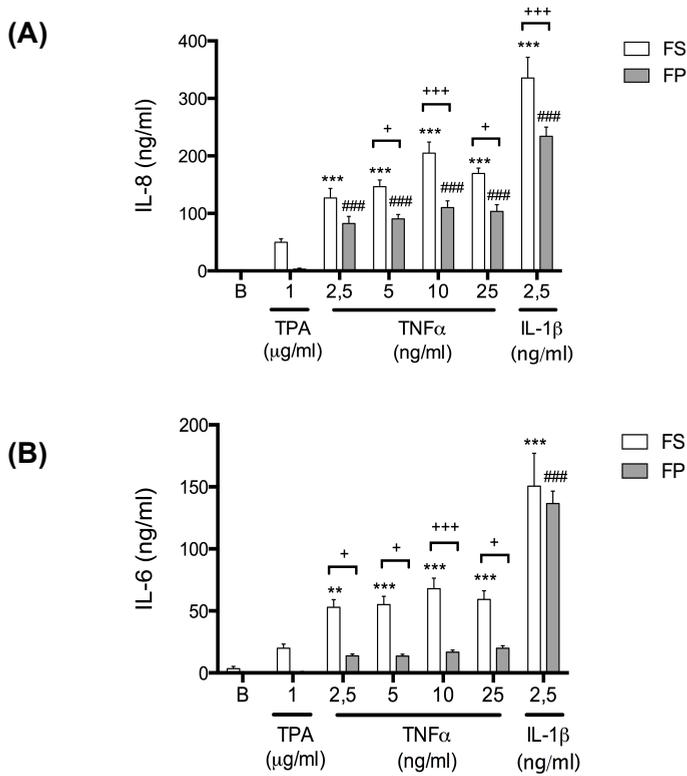


**Figura 26.** Ensayo de viabilidad celular (MTT). Valores de absorbancia a 490 nm. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 8-12). Test de comparación múltiple de Sidak. B: células no estimuladas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Por otra parte, se observa que las distintas concentraciones de TNF $\alpha$  y los estímulos IL1- $\beta$  y TPA no afectan a la viabilidad celular, pues no se produce una variación significativa de los valores de absorbancia de las células estimuladas respecto a las células basales en ninguna de las dos poblaciones estudiadas. Asimismo, tampoco existen diferencias en el metabolismo del MTT entre FS y FP para ninguno de los estímulos ensayados. Sin embargo, es apreciable un ligero aumento no significativo en la reducción del MTT por las células estimuladas con IL1- $\beta$ , tanto FS como FP, respecto a sus respectivos valores basales, que podría corresponderse a la capacidad proliferativa ya descrita de esta citocina (Gitter y cols., 1989; Vesey y cols., 2002).

### 2.1.3. Determinación de IL-8 e IL-6 por ELISA

Se han determinado los niveles de IL-8 e IL-6 en los sobrenadantes de fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos incubados durante 24h con las distintas concentraciones de TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  y TPA (figura 27).



**Figura 27.** Determinación de IL-8 e IL-6 en sobrenadantes de fibroblastos sanos y fibroblastos psoriáticos. **(A)** Niveles de IL-8 **(B)** Niveles de IL-6. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 8-12). Test de comparación múltiple de Sidak, \* $p$  <0,05, \*\* $p$  <0,01, \*\*\* $p$  <0,001 FS respecto B FS. #### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. + $p$  <0,05, +++ $p$  <0,001 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriáticos.

Como se observa en la figura 27A y 27B, tanto en los FS como en los FP, el estímulo con IL1- $\beta$  es el que produce mayor liberación de IL-8 ( $335,41 \pm 36,09$  ng/ml y  $234,09 \pm 16,18$  ng/ml, respectivamente) e IL-6 ( $150,65 \pm 26,4$  ng/ml y  $136,52 \pm 10,10$  ng/ml, respectivamente), si bien la liberación de ambas citocinas es siempre menor en los fibroblastos psoriáticos, siendo las diferencias significativas en el caso de la IL-8.

En cuanto a las concentraciones de TNF $\alpha$  ensayadas, observamos como existe una relación concentración-dependiente en la liberación tanto de IL-8 como de IL-6, alcanzando un máximo de producción de ambas citocinas para la concentración de 10 ng/ml. Aquí es importante destacar que la liberación de IL-8 e IL-6 es significativamente menor para todas las concentraciones de TNF $\alpha$  ensayadas en FP, mostrando una capacidad de respuesta de este tipo de fibroblasto claramente reducida.

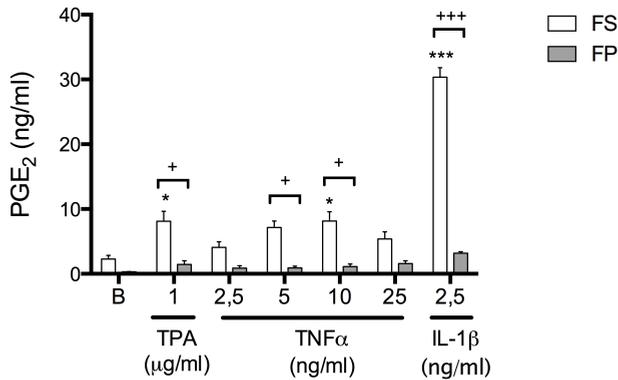
Por otra parte, en fibroblastos sanos, la activación de la PKC por TPA produce una ligera liberación de IL-8 e IL-6 en comparación al resto de estímulos que no resulta ser estadísticamente significativa. En fibroblastos psoriásicos, el TPA no produjo una respuesta apreciable.

### **2.1.4. Determinación de la producción de PGE<sub>2</sub> por RIA**

Hemos determinado mediante RIA los niveles de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los FS y FP tras haber sido incubados durante 24h con los estímulos inflamatorios mencionados (Figura 28).

Como cabría esperar, la estimulación con IL1- $\beta$  y TPA produce una liberación significativa del prostanoide en fibroblastos sanos ( $30,32 \pm 1,47$  ng/ml y  $8,13 \pm 1,54$  ng/ml respectivamente), siendo mayor para el primer estímulo. Además, tal y como sucede en el perfil de liberación de IL-6 e IL-8, también existe una producción concentración-dependiente de PGE<sub>2</sub> en los FS estimulados con TNF- $\alpha$ , alcanzando un máximo de liberación a la concentración de 10 ng/ml ( $8,16 \pm 1,43$  ng/ml).

Sin embargo, ninguno de los estímulos es capaz de producir variaciones significativas en la liberación de PGE<sub>2</sub> en los fibroblastos psoriásicos. Asimismo, también encontramos niveles superiores del prostanoide en condiciones basales en FS respecto a FP ( $2,29 \pm 0,57$  ng/ml vs.  $0,31 \pm 0,038$  ng/ml). Por tanto, en FP existe una respuesta anómala en la producción de la PGE<sub>2</sub>, tanto en condiciones basales como en un ambiente proinflamatorio.



**Figura 28.** Determinación de PGE<sub>2</sub> por RIA en sobrenadantes de fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 8-12). Test de comparación múltiple de Sidak, \**p* <0,05, \*\*\**p* <0,001 FS estimulados respecto B FS. +*p* <0,05, +++*p* <0,001 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar muestran que los fibroblastos psoriásicos no manifiestan diferencias en cuanto al ratio de crecimiento o viabilidad respecto a los fibroblastos sanos. Sin embargo, si que presentan una menor capacidad de respuesta a diversos estímulos proinflamatorios, produciendo una menor liberación tanto de citocinas como de PGE<sub>2</sub>. Estos resultados nos han llevado a desarrollar un estudio posterior con el fin de intentar elucidar los mecanismos implicados en esta disminución de la respuesta.

### **2.2. Vías de señalización implicadas en la liberación de IL-6 e IL-8 en fibroblastos dérmicos sanos y psoriásicos**

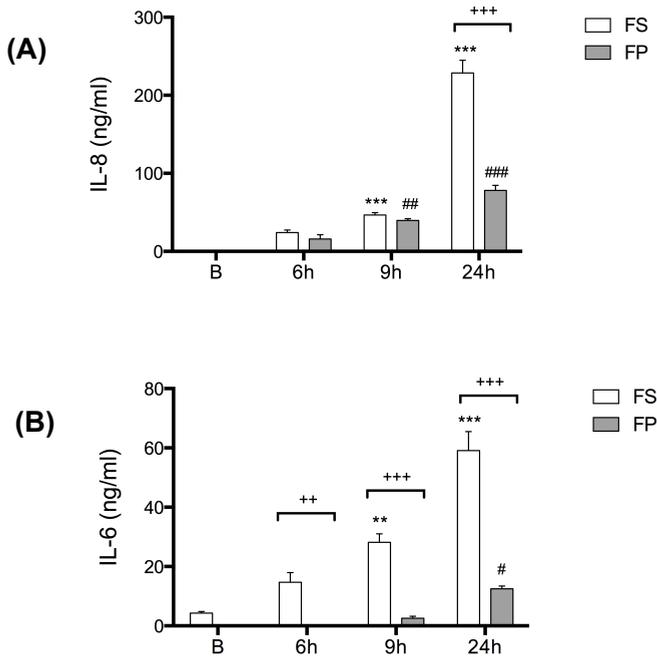
Para el estudio de los mecanismo implicados en la liberación de ambas citocinas hemos decidido emplear el estímulo de TNF $\alpha$ , ya que es el que proporciona diferencias más marcadas entre fibroblastos sanos y psoriásicos, seleccionando la concentración de 10 ng/ml, por ser la que muestra mejores resultados en el estudio preliminar.

#### **2.2.1. Estudio tiempo-dependiente de liberación de IL-8 e IL-6**

Inicialmente, y con el fin de descartar niveles máximos de estas citocinas a tiempos más cortos, realizamos un ensayo tiempo-dependiente en el que cuantificamos la concentración de IL-8 e IL-6 en el sobrenadante celular de fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos a diferentes tiempos a lo largo de las 24h de estimulación con TNF $\alpha$ .

Los resultados reflejados en la figura 29A muestran como la liberación de IL-8 por FS estimulados comienza a detectarse significativamente a las 9h ( $46,74 \pm 2,89$  ng/ml) y se incrementa notablemente hasta las 24h ( $228,64 \pm 16,14$  ng/ml) posteriores al estímulo inflamatorio. En cambio, en FP estimulados observamos que si bien los niveles de IL-8 obtenidos a las 9h ( $39,54 \pm 2,35$  ng/ml) son aproximadamente de la misma magnitud que en los FS, el incremento final producido a las 24h es mucho menor ( $78,18 \pm 6,34$  ng/ml).

En cuanto a la IL-6, podemos observar como la liberación de esta citocina aumenta con el tiempo, siendo los valores estadísticamente significativos para los fibroblastos sanos a partir de las 9h. La liberación de IL-6 por FP estimulados está claramente disminuida a todos los tiempos en comparación con los FS (Figura 29B).

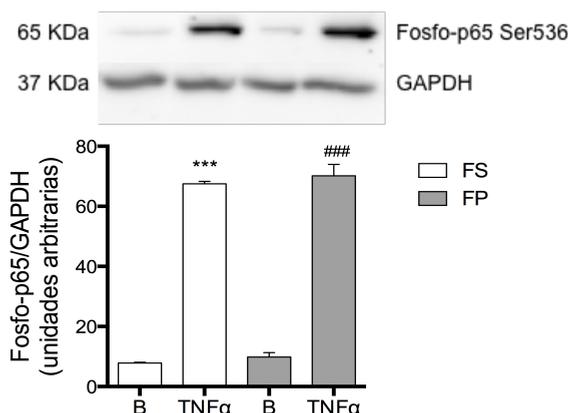


**Figura 29.** Estudio de tiempo-dependencia de liberación de IL-8 **(A)** e IL-6 **(B)**. Se determinaron por ELISA los niveles de interleucinas en los sobrenadantes de fibroblastos incubados durante distintos tiempos con TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 8-12). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  FS estimados respecto B FS. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  FP estimados respecto B FP. ++ $p < 0,01$ , +++ $p < 0,001$  FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

### 2.2.2. Análisis de la activación de NF- $\kappa$ B

Se conoce que la activación de los fibroblastos por TNF $\alpha$  es capaz de producir el aumento de IL-8 e IL-6 vía activación del NF- $\kappa$ B (Buckley y cols, 2001). Habiendo obtenido diferencias importantes en la liberación de ambas citocinas, nos planteamos el estudio de esta vía de señalización en FS y FP. Para ello, estimulamos ambos tipos de fibroblastos con TNF $\alpha$  y analizamos la activación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B por Western Blot 30min después de recibir el estímulo.

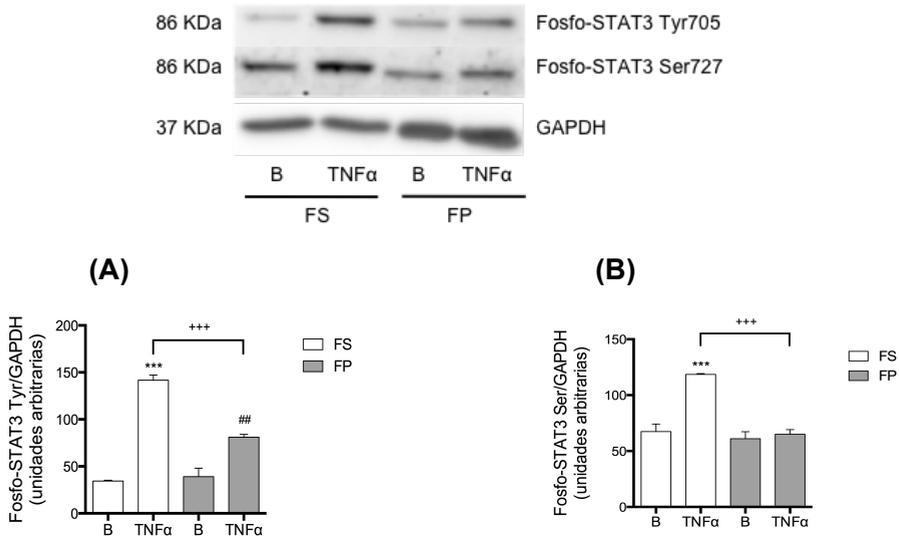
Como se muestra en la figura 30, el TNF $\alpha$  produce una fosforilación similar de la p65, tanto en FS como en FP. Tampoco se observan diferencias en la fosforilación de p65 en condiciones basales entre ambos tipos de fibroblastos. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la vía de señalización de NF- $\kappa$ B no se encuentra alterada en fibroblastos procedentes de piel psoriásica.



**Figura 30.** Análisis de la activación de la subunidad p65 del complejo NF- $\kappa$ B. Las células fueron incubadas durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de p65 fosforilada por densitometría. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. ### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

### 2.2.3. Análisis de la activación de STAT3

Como se ha comentado anteriormente, el factor de transcripción STAT3 está muy implicado en la patología psoriásica. La IL-6 exógena activa la vía de señalización Jak-STAT, produciendo más IL-6. De esta forma, concentraciones superiores de IL-6 ocasionarían una mayor activación de STAT3 por aumento de la fosforilación del residuo de Tyr705.



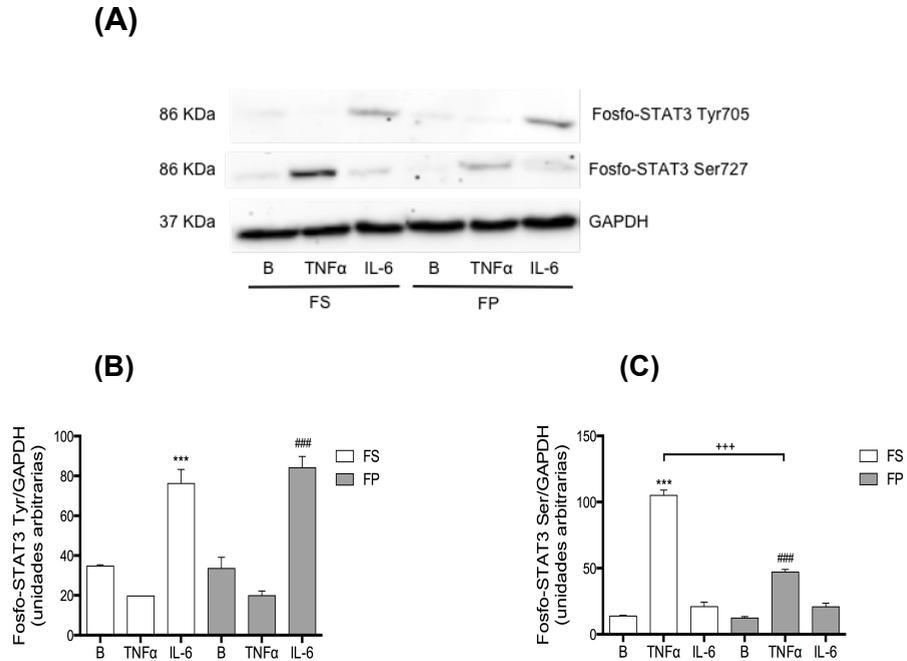
**Figura 31.** Análisis de la activación de STAT3 a 6h. Las células fueron incubadas durante 6h con TNFα (10 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y los análisis de la expresión de STAT3 fosforilada por densitometría. **(A)** Densitometría de la fosforilación en el residuo de Tyr705 de STAT3. **(B)** Densitometría de la fosforilación en el residuo de Ser727 de STAT3. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\**p* <0,001 FS estimulados respecto B FS. ###*p* <0,01 FP estimulado respecto B FP. +++*p* <0,001 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

En base a los resultados obtenidos en el estudio tiempo-dependiente respecto a la liberación de IL-6, nos planteamos analizar las posibles diferencias en cuanto a la activación de STAT3 en FS y FP 6h después de estimular las células con TNFα.

Como se aprecia en la figura 31, los fibroblastos sanos producen un incremento mayor de la fosforilación de Tyr705 en comparación con los fibroblastos psoriásicos, lo que podría deberse a los niveles disminuidos de IL-6 producidos por estos últimos.

## RESULTADOS

Por otra parte, es importante destacar que también se produce una menor fosforilación del residuo de Ser727 del STAT3 en fibroblastos psoriásicos estimulados respecto a los sanos, lo que indica en general una menor capacidad de activación de la vía STAT3 en este tipo celular.



**Figura 32.** Análisis de la activación de STAT3 a 30min. Las células fueron incubadas durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o IL-6 (10 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. **(A)** Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. **(B)** Densitometría de la fosforilación en el residuo de Tyr705 de STAT3. **(C)** Densitometría de la fosforilación en el residuo de Ser727 de STAT3. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. #### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. +++ $p$  <0,001 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Para confirmar si esta disminución de la fosforilación de STAT3 se debe a un posible defecto en las fases iniciales de la activación de este factor de transcripción, decidimos estudiar de nuevo la fosforilación de los residuos de Tyr705 y Ser727 30min después de estimular ambos tipos de

fibroblastos con TNF $\alpha$  (principal activador de la fosforilación de Ser727) e IL-6 (principal activador de la fosforilación de Tyr705).

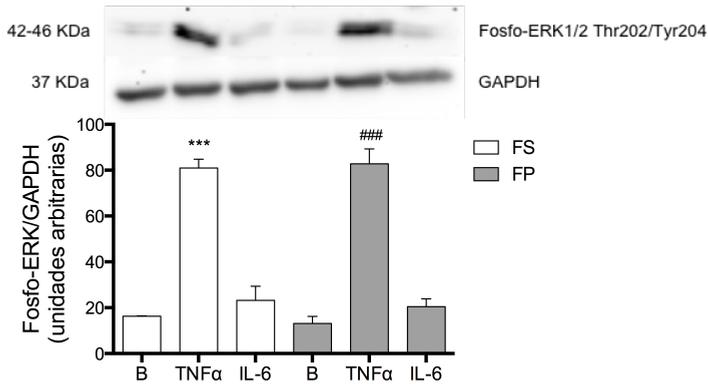
En la figura 32 se muestra como el estímulo de IL-6 conlleva un aumento similar en la fosforilación de la Tyr705 del STAT3 en ambos tipos de fibroblastos, lo que indica que inicialmente la vía de activación Jak-STAT3, dependiente de IL-6, no estaría afectada en fibroblastos psoriásicos y que la disminución de la fosforilación de la Tyr705 del STAT3 observada tras 6h de estímulo con TNF $\alpha$  podría ser debida a los niveles disminuidos de IL-6. Sin embargo, sí que advertimos una disminución significativa en la activación de la fosforilación del residuo de Ser727 en FP, pudiendo ser esta vía la posiblemente afectada en este tipo celular.

#### **2.2.4. Análisis de las vías de señalización de MAPK**

La fosforilación del residuo de Ser727 de STAT3 en fibroblastos depende fundamentalmente de la actividad de las MAPK (Chung y cols., 1997; Uddin y cols., 2000; Zhang y cols., 2001). Para determinar si existen fallos en la señalización de MAPK que pudieran justificar la fosforilación disminuida del residuo de Ser, hemos estudiado la activación de ERK, p38 y JNK en FS y FP 30min después de ser estimulados con TNF $\alpha$  e IL-6.

##### 2.2.4.1. Fosforilación de ERK1/2

En la figura 33 se puede observar como el estímulo con TNF $\alpha$  produce la activación de las ERK de manera similar en fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos. Por el contrario, la IL-6 no produce una fosforilación significativa de estas cinasas en ambos tipos de células. Asimismo, también advertimos fosforilación similar de ERK en condiciones basales.

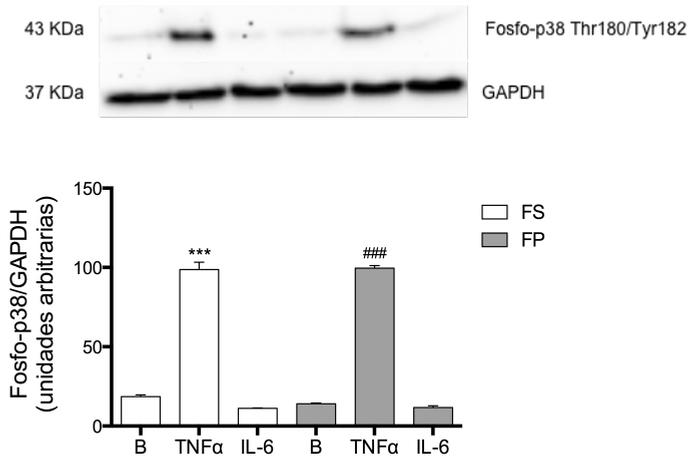


**Figura 33.** Análisis de la activación de ERK1/2. Las células fueron incubadas durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o IL-6 (10 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de la fosforilación de ERK1/2 por densitometría. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. ### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

#### 2.2.4.2. Fosforilación de p38

Como se observa en la figura 34, el estímulo de TNF $\alpha$  también conlleva un aumento similar en la fosforilación de p38 tanto en fibroblastos sanos como en fibroblastos psoriásicos.

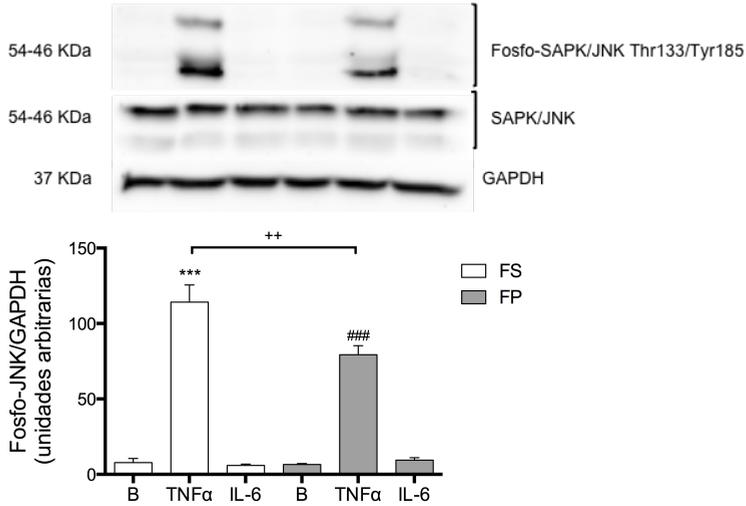
Por otra parte, no se observa tampoco fosforilación de p38 al estimular con IL-6 en ninguno de los dos tipos celulares.



**Figura 34.** Análisis de la activación de p38. Las células fueron incubadas durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o IL-6 (10 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de la fosforilación de p38 por densitometría. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. ### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

#### 2.2.4.3. Fosforilación de SAPK/JNK

Tal y como sucede con las MAPK anteriores, la IL-6 tampoco es capaz de activar a SAPK/JNK (Figura 35). Sin embargo, aquí sí que se aprecian diferencias en la fosforilación de esta cinasa al estimular ambos tipos de fibroblastos con TNF- $\alpha$ . Así, podemos observar como existe un nivel significativamente menor de JNK fosforilada en fibroblastos psoriásicos en comparación con los fibroblastos sanos,

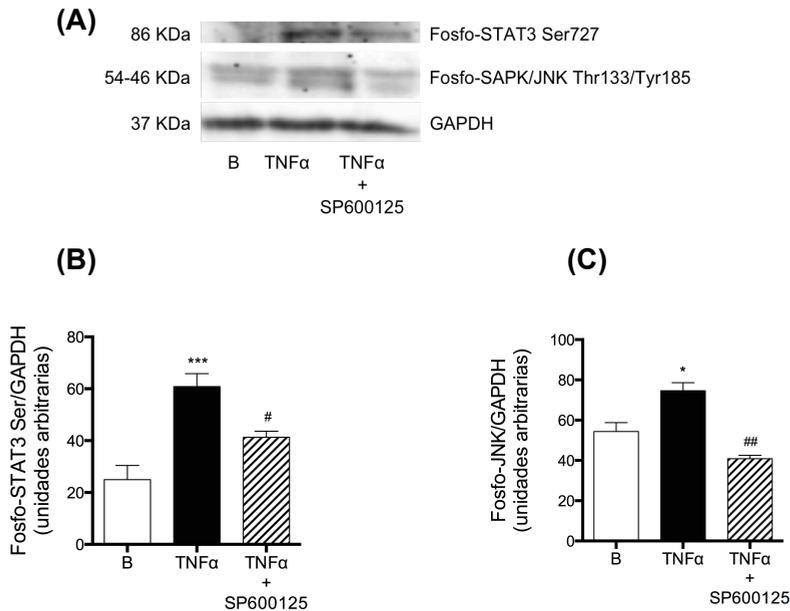


**Figura 35.** Análisis de la activación de SAPK/JNK. Las células fueron incubadas durante 30min con TNFα (10 ng/ml) o IL-6 (10 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de la fosforilación de JNK por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. ### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. ++ $p$  <0,01 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Con las diferencias de fosforilación observadas decidimos estudiar la expresión de SAPK/JNK total. Como se muestra en la imagen, en este caso los niveles de expresión son semejantes en ambos tipos de fibroblastos. Estos resultados sugieren por lo tanto una posible alteración en la vía de activación de esta cinasa en fibroblastos psoriásicos, pero no en su expresión.

**2.2.5. Confirmación de la MAPK responsable de la fosforilación en Ser727 de STAT3 en fibroblastos sanos**

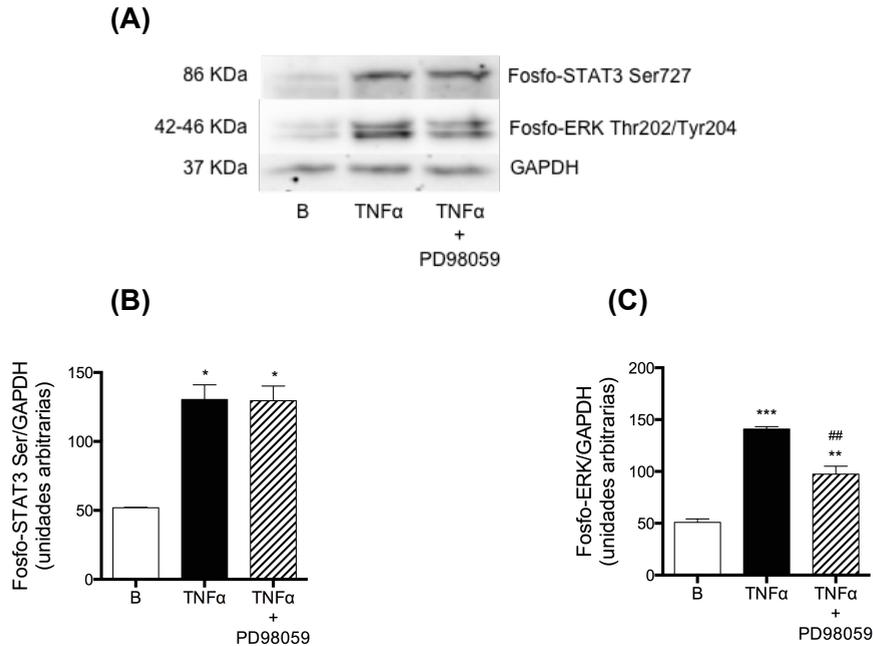
En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, y con el fin de confirmar si SAPK/JNK es la principal cinasa implicada en la fosforilación del residuo Ser727 de STAT3 en condiciones normales, hemos realizado de nuevo el estudio de fosforilación en fibroblastos sanos en presencia de diversos inhibidores de MAPK.



**Figura 36.** Análisis comparativo de la fosforilación de STAT3 Ser727 en fibroblastos sanos en presencia del inhibidor de SAPK/JNK (SP600125). Los fibroblastos sanos fueron preincubados 30min con el inhibidor y posteriormente incubados durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) en ausencia o presencia del inhibidor a la concentración 50  $\mu$ M. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes **(A)** y los análisis de la expresión por densitometría **(B)** y **(C)**. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3). *t* de Dunnett \**p* < 0,05, \*\*\**p* < 0,001 estimulados respecto B. #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01 fibroblastos estimulados con TNF $\alpha$  y el inhibidor respecto fibroblastos estimulados con TNF $\alpha$ . B: células no tratadas, SP600125: Inhibidor SAPK/JNK

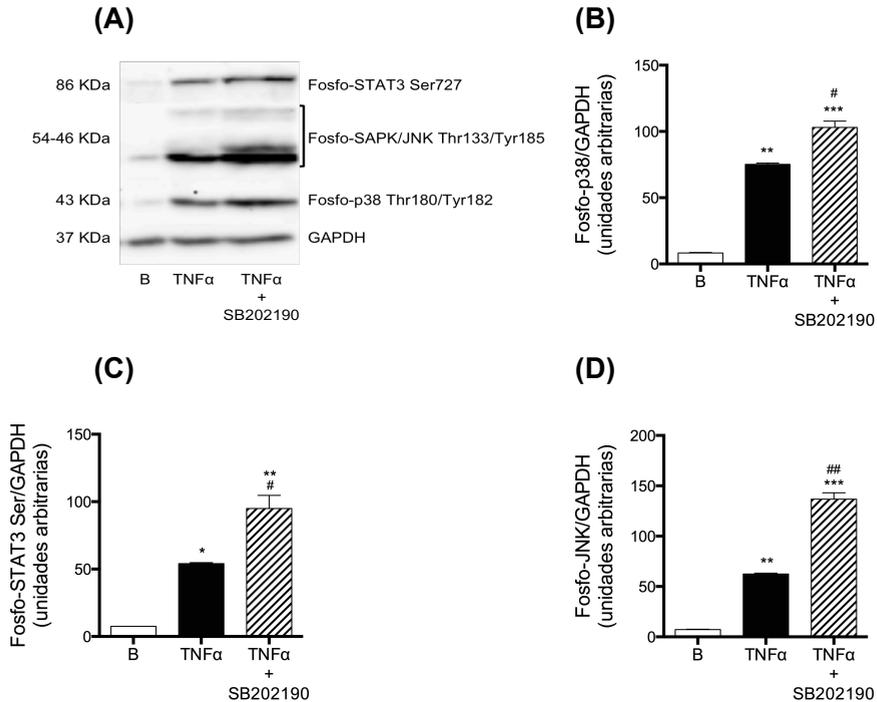
## RESULTADOS

Para ello, los fibroblastos sanos han sido preincubados durante 30min con los correspondientes inhibidores de SAPK/JNK (SP600125), ERK1/2 (PD98059) y p38 (SB202190) a la concentración 50  $\mu$ M, Posteriormente se ha realizado el estímulo con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) durante 30 min, procediendo finalmente a la lisis celular y el estudio de Western Blot.



**Figura 37.** Análisis comparativo de la fosforilación de STAT3 Ser727 en fibroblastos sanos en presencia del inhibidor de ERK1/2 (PD98059). Los fibroblastos sanos fueron preincubados 30min con el inhibidor y posteriormente incubados durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) en ausencia o presencia del inhibidor a la concentración 50  $\mu$ M. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes (A) y los análisis de la expresión por densitometría (B) y (C). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3). t de Dunnett \* $p$  <0,05, \*\* $p$  <0,01, \*\*\* $p$  <0,001 estimulados respecto B. ## $p$  <0,01 fibroblastos estimulados con TNF $\alpha$  y el inhibidor respecto fibroblastos estimulados con TNF $\alpha$ . B: células no tratadas, PD98059: Inhibidor ERK1/2.

Como puede observarse en la figura 36, el compuesto SP600125 produce una inhibición significativa de la fosforilación tanto de SAPK/JNK como del residuo Ser727 de STAT3. En cambio, el inhibidor de ERK1/2 (PD98059) solo es capaz de inhibir su correspondiente cinasa no afectando a la fosforilación de dicho factor de transcripción (figura 37).



**Figura 38.** Análisis de la expresión de STAT3, p38 y SAPK/JNK fosforiladas. Los fibroblastos sanos fueron incubados durante 30min con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) en ausencia o presencia de SB202190 (50  $\mu$ M). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. **(A)** Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. **(B)** Densitometría de la fosforilación de p38. **(C)** Densitometría de la fosforilación en el residuo de Ser727 de STAT3. **(D)** Densitometría de la fosforilación de SAPK/JNK. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). *t* de Dunnett \**p* <0,05, \*\**p* <0,01, \*\*\**p* <0,001 estimulados respecto B. #*p* <0,05, ###*p* <0,01 fibroblastos estimulados con TNF $\alpha$  respecto fibroblastos estimulados con TNF $\alpha$  y SB202190. B: células no tratadas, SB202190: inhibidor p38.

Sorprendentemente, al emplear el inhibidor de p38, SB202190, observamos un aumento de la fosforilación tanto de p38 como del residuo de Ser727 STAT3 (Figura 38). En este sentido, es de resaltar que

SB202190 inhibe la actividad p38, pero no su fosforilación, pudiendo incluso estar aumentada (Guo y Xie, 2005).

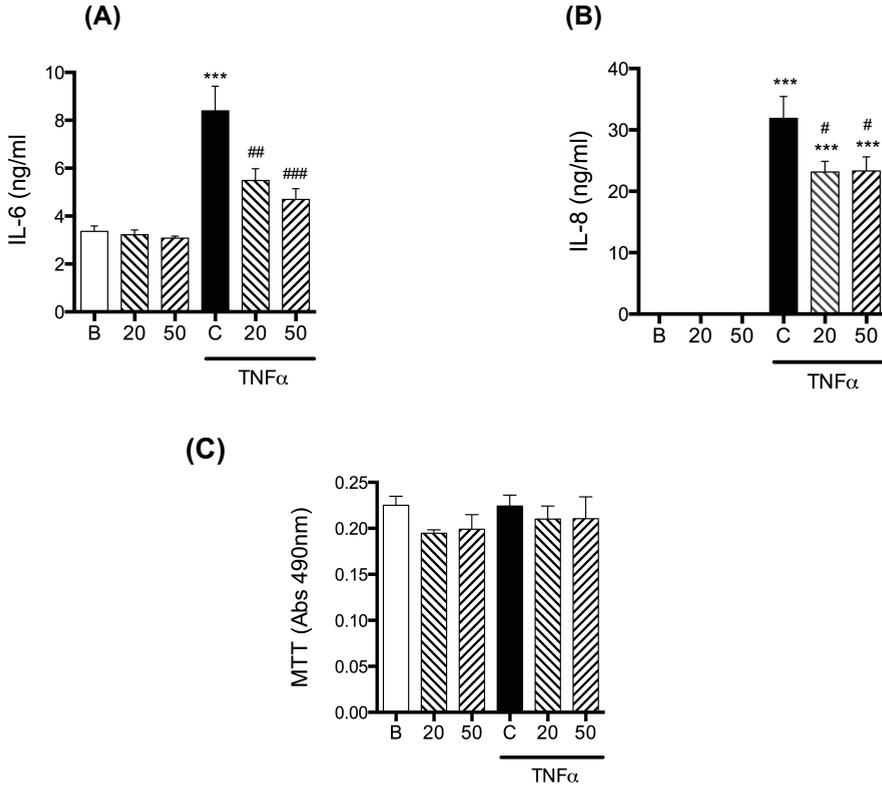
Por otra parte algunos autores apuntan que la inhibición de p38 puede aumentar la actividad JNK en distintos tipos celulares (Muniyappa y Das, 2008), Esto justificaría el aumento de la fosforilación de Ser727 de STAT3 que produce el tratamiento con SB202190. De hecho, hemos realizado el estudio de Western Blot para SAPK/JNK en presencia del inhibidor de p38, observando que efectivamente, aumenta la fosforilación de JNK en fibroblastos sanos (Figura 38).

### **2.2.6. Generación de IL-8 e IL-6 en fibroblastos sanos en presencia del inhibidor de SAPK/JNK**

Una vez confirmada la participación de SAPK/JNK en la fosforilación de Ser727 del STAT3, hemos decidido estudiar la posible participación de esta cinasa en la generación de IL-8 e IL6 en fibroblastos sanos.. Para ello, preincubamos los FS con el inhibidor de SAPK/JNK durante 30min y estimulamos con TNF $\alpha$  durante 6h.

Tal como se observa en la figura 39A y 39B, el aumento de los niveles de IL-6 e IL-8 tras el estímulo con TNF $\alpha$  es reducido significativamente por el inhibidor de SAPK/JNK a las dos concentraciones ensayadas, confirmando por lo tanto que la generación de ambas citocinas depende de la activación de dicha cinasa.

Paralelamente se ha llevado a cabo el ensayo de viabilidad celular, observando que ninguna de las dos concentraciones ensayadas de SP600125 presenta diferencias significativas en la reducción del MTT respecto a las células control. De este modo descartamos que el efecto observado a nivel de citocinas sea debido a un posible efecto citotóxico de este inhibidor de SAPK/JNK (Figura 39C).



**Figura 39.** Generación de IL-6 **(A)** e IL-8 **(B)** en presencia del inhibidor de SAPK/JNK. Se determinaron por ELISA los niveles de interleucinas presentes a las 6h en los sobrenadantes de fibroblastos preincubados con SP600125 y posteriormente estimulados con TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Ensayo de viabilidad celular **(C)**. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). *t* de Dunnett \*\*\**p* <0,001 fibroblastos estimulados respecto B. #*p* <0,05, ##*p* <0,01, ###*p* <0,001 fibroblastos estimulados respecto C. B: células no tratadas, C: células tratadas con TNF $\alpha$  (10 ng/ml), 20: células tratadas con SP600125 (20  $\mu$ M), 50: células tratadas con SP600125 (50  $\mu$ M),

Así pues, nuestros resultados sugieren que la alteración de la vía de señalización de JNK en fibroblastos psoriásicos podría ser responsable de los niveles inferiores de IL-6 e IL-8 producidos por el estímulo de TNF $\alpha$  en estas células.

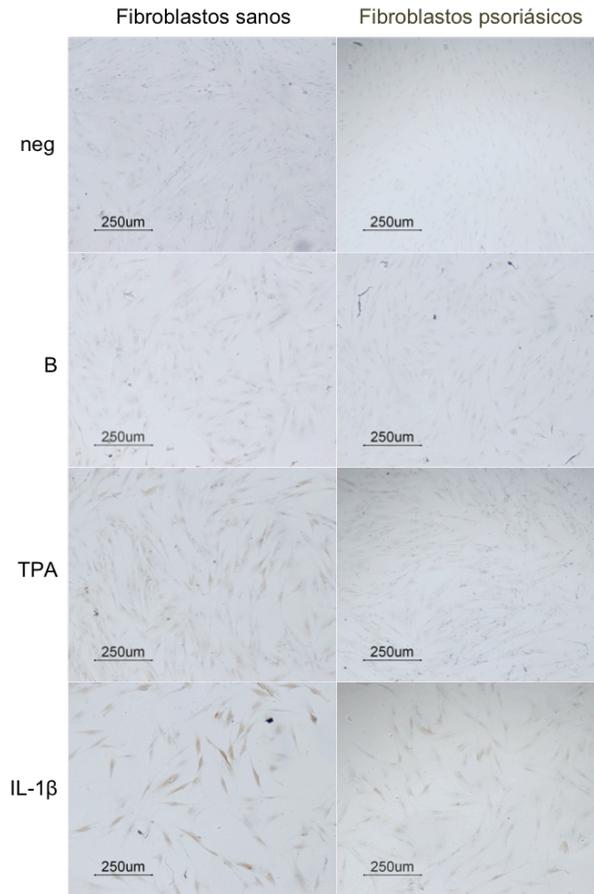
### **2.3. Estudio de COX-2 en fibroblastos dérmicos sanos y psoriásicos.**

En vista de los resultados obtenidos en los estudios preliminares acerca de la reducida liberación de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos psoriásicos, decidimos centrarnos en el estudio de la enzima responsable de la síntesis de este eicosanoide y en las vías de señalización implicadas en su expresión, empleando los estímulos de IL-1 $\beta$  (2,5 ng/ml), citocina comúnmente utilizada para inducir la producción de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos dérmicos, y TPA (1  $\mu$ g/ml) ya que produce niveles elevados del prostanoide mediante una vía de activación independiente de receptor.

#### **2.3.1. Análisis de la expresión de COX-2 por inmunocitoquímica**

En primer lugar, decidimos realizar un estudio inmunocitoquímico de este enzima tanto en fibroblastos sanos como psoriásicos, comparando el efecto de la IL-1 $\beta$  y del TPA en ambas poblaciones celulares.

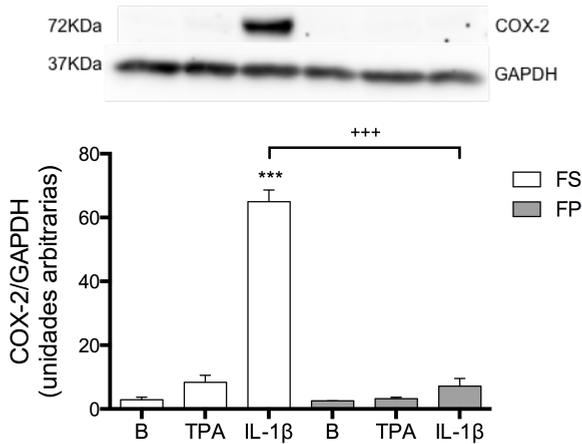
En la figura 40, observamos que la expresión basal de COX-2 por células no estimuladas es prácticamente nula tanto para FS como FP. Como era de esperar, el estímulo con IL-1 $\beta$  incrementa visiblemente la expresión de COX-2 en FS, ya que todas las células presentan tinción positiva, aunque con diferentes grados de intensidad. El TPA induce también la expresión de COX-2, pero con menor intensidad que la observada tras el estímulo con IL-1 $\beta$ . En cambio, el patrón de expresión de COX-2 en FP estimulados con TPA es muy similar a los FS no estimulados. Únicamente la IL-1 $\beta$  induce la expresión de esta enzima, aunque notablemente inferior a la producida en FS.



**Figura 40.** Expresión de COX-2 por inmunocitoquímica. Las células fueron incubadas 24h con TPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o IL-1 $\beta$  (2,5 ng/ml). En marrón se muestra la tinción positiva COX-2. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. B: células no estimuladas, neg: control negativo.

### 2.3.2. Análisis de la expresión de COX-2 por Western Blot

Los resultados obtenidos en el ensayo de inmunocitoquímica se han confirmado mediante el análisis de los homogenados celulares por Western Blot, técnica que permite determinar el tamaño aparente de la proteína, así como su expresión.



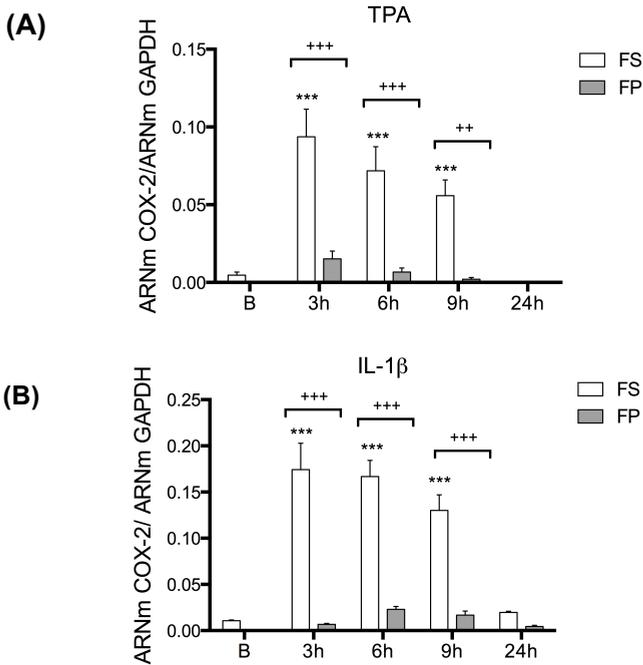
**Figura 41.** Análisis de la expresión proteica de COX-2. Las células fueron incubadas con TPA (1 µg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml) durante 24h. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión COX-2 por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p < 0,001$  FS estimulados respecto B FS. +++ $p < 0,001$  FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

En la Figura 41 se muestra claramente la aparición de una banda aproximadamente a 72 kDa, que corresponde a la inducción de la expresión de COX-2 tras estimular los FS durante 24h con IL-1β. Asimismo, aunque no se observa en la imagen del Western Blot ni resulta ser estadísticamente significativo, el TPA es capaz de inducir ligeramente la COX-2 en FS, tal y como se advierte en la densitometría.

Por otra parte, los FP estimulados con IL-1β inducen ligeramente COX-2 (dato reflejado en la densitometría), aunque no resulta ser estadísticamente significativo.

2.3.3. Análisis de la expresión de COX-2 por RT-PCR a tiempo real

Los resultados obtenidos por inmunocitoquímica y Western Blot nos han llevado a cuantificar los niveles de ARN mensajero de COX-2 en FS y FP a distintos tiempos con el fin de comprobar si existen alteraciones en la transcripción del gen que codifica para COX-2.



**Figura 42.** Expresión génica de COX-2 en fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos. Las células se incubaron con TPA (1µg/ml) (A) o IL-1β (2,5 ng/ml) (B) durante distintos tiempos y la expresión de ARNm de COX-2 se determinó por RT-PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 4-6). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\**p* <0,001 FS estimulados respecto B FS. +++*p* <0,001, ++*p* <0,01 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Tal y como se muestra en la figura 42, los fibroblastos sanos estimulados con IL-1 $\beta$  (Figura 42B) producen niveles superiores de ARNm que los fibroblastos sanos estimulados con TPA (Figura 42A), resultado que está en concordancia con el observado previamente en los análisis de esta enzima mediante inmunocitoquímica y Western Blot. También es importante resaltar que existe un pico máximo de ARNm entre las 3h y las 6h después del estímulo, que coincide tanto para los FS estimulados con IL-1 $\beta$  como para los FS estimulados con TPA.

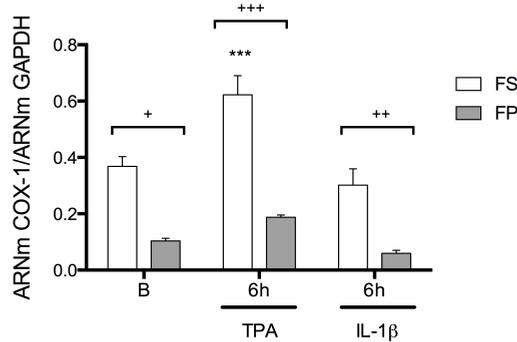
Por otra parte, los fibroblastos psoriásicos estimulados con IL-1 $\beta$  o TPA apenas sintetizan ARNm de COX-2, poniendo de manifiesto una deficiencia en la transcripción del gen que codifica para esta enzima que puede residir tanto en la maquinaria encargada de la transcripción génica, como en la vía de señalización implicada en la COX-2.

### **2.3.4. Análisis de la expresión de COX-1 por RT-PCR a tiempo real**

Paralelamente, también se ha llevado a cabo el estudio de la expresión de ARNm de COX-1 en FS y FP con el fin de determinar posibles diferencias en esta isoenzima constitutiva. Para ello, se han determinado tanto los niveles de ARNm de COX-1 de células sin estimular como de células estimuladas.

Como se observa en la figura 43, los FS presentan niveles basales de ARNm de COX-1 significativamente superiores a los hallados en FP, que justificarían las diferencias en los niveles basales de liberación de PGE<sub>2</sub> observadas en los estudios preliminares.

Por otra parte, es interesante mencionar que si bien el estímulo con IL-1 $\beta$  no produjo diferencias de expresión respecto a los fibroblastos sin estimular, el TPA es capaz de aumentar la síntesis de ARNm de esta enzima tanto en FS como en FP, revelando así una posible inducción de la COX-1.



**Figura 43.** Expresión génica de COX-1 en fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos. Las células se incubaron con TPA (1µg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml) durante 6h y la expresión de ARNm de COX-1 se determinó por RT-PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 4-6). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p < 0,001$  FS estimulados respecto B FS. +++ $p < 0,001$ , ++ $p < 0,01$ , + $p < 0,05$  FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

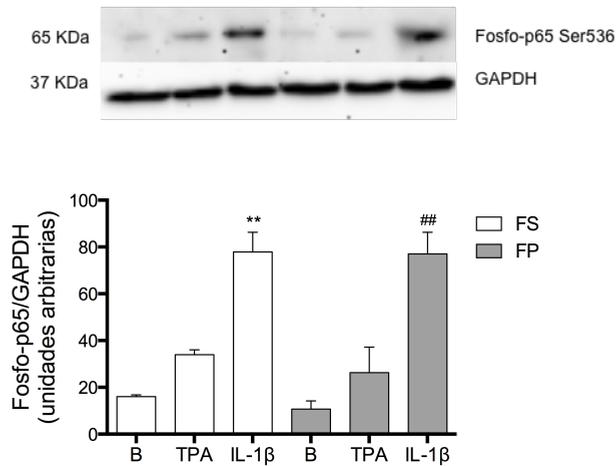
### 2.3.5. Análisis de la señalización celular responsable de la síntesis de COX-2

Una vez confirmado el defecto en la transcripción del gen COX-2 en fibroblastos psoriásicos y su consiguiente déficit en la síntesis de esta proteína, procedemos al estudio de algunas de las vías de señalización implicadas en la expresión de COX-2, como los factores de transcripción NF-κB y CREB o las MAPK, con la finalidad de caracterizar posibles alteraciones o diferencias en alguna de ellas.

#### 2.3.5.1. Vía de señalización NF-κB

En este apartado se estudiaron las posibles diferencias de activación de NF-κB tanto por la vía canónica como no canónica, realizando el análisis por Western Blot del homogenado total de fibroblastos sanos y psoriásicos.

a) Fosforilación de p65 (vía canónica)

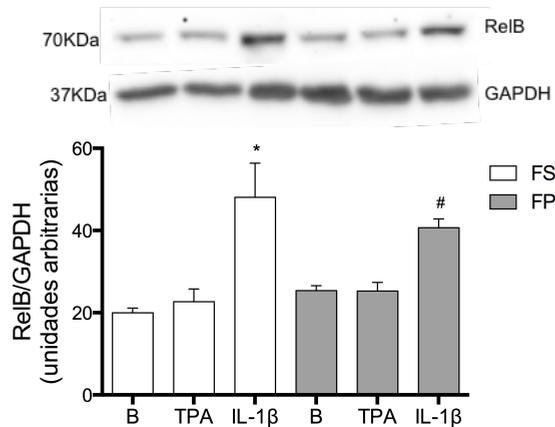


**Figura 44.** Análisis de la fosforilación de la subunidad p65 del complejo NF-κB. Las células fueron incubadas durante 15min con TPA (1μg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de p65 fosforilada por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\* $p < 0,01$  FS estimulados respecto B FS. ## $p < 0,01$  FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Tal y como podemos observar en la figura 44, en fibroblastos sanos y psoriásicos estimulados durante 15min, se produce un aumento de la fosforilación de la subunidad p65 del complejo NF-κB tanto con el estímulo de TPA como con IL-1β, si bien únicamente este último presenta diferencias significativas respecto a los valores basales. Por otra parte, es de señalar que tanto fibroblastos sanos como fibroblastos psoriásicos muestran un mismo patrón de fosforilación no existiendo diferencias entre ambos tipos celulares. Por lo tanto, podemos deducir que no existe una alteración en la vía canónica de activación de NF-κB tal como ya se había observado en el estudio realizado anteriormente para las citocinas.

*b) Estudio de la expresión de RelB (vía no canónica) y miR-146*

McMillan y cols describieron en el 2013 que, tanto el factor de transcripción RelB del complejo NF-κB, como el microRNA-146a (miR-146a), participan de manera conjunta en la regulación a la baja de la expresión de la COX-2 en fibroblastos procedentes de pulmón (McMillan y cols., 2013). De esta manera, la activación de RelB por agentes como IL-1β aumentaría la expresión de miR-146a, llevando a la disminución de la inducción tanto de COX-2 como de citocinas proinflamatorias. Por tanto, nos planteamos en este apartado el estudio de la posible alteración en la vía de activación RelB/miR-146a en fibroblastos sanos y psoriásicos.

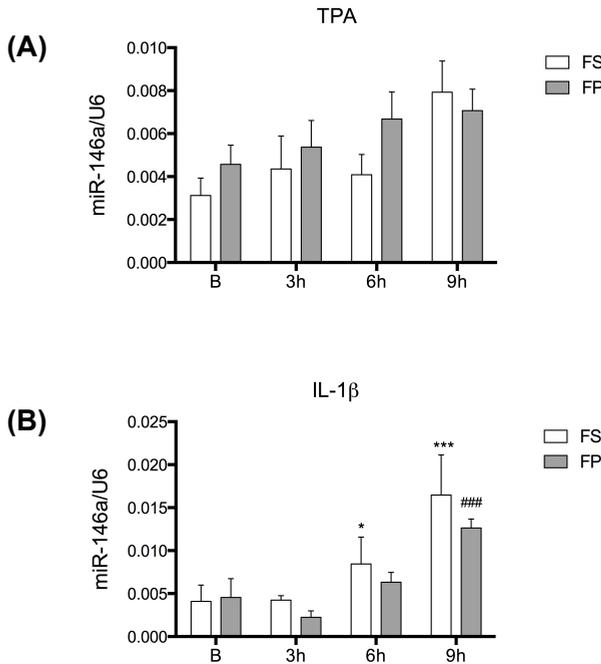


**Figura 45.** Análisis de la expresión proteica de RelB por Western Blot. Las células fueron incubadas con TPA (1 μg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml) durante 6h. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de RelB por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \**p* <0,05 FS estimulados respecto B FS. #*p* <0,05 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Inicialmente incubamos los fibroblastos durante 6h en presencia de IL-1β o TPA con el fin de analizar la expresión de RelB mediante Western Blot. Como se muestra en la figura 45, no existen diferencias significativas en la expresión de este factor de transcripción entre fibroblastos sanos y

psoriásicos, presentando en ambas poblaciones celulares, una mayor activación de RelB con el estímulo de IL-1 $\beta$ .

Paralelamente, y a pesar de no obtener diferencias respecto a la activación de RelB, decidimos determinar por RT-PCR a tiempo real los niveles de miR-146a presentes en fibroblastos sanos y psoriásicos.



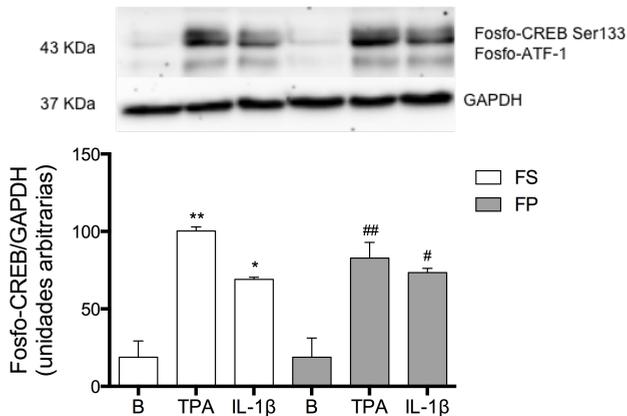
**Figura 46.** Expresión de miR-146a en fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos. Las células se incubaron con TPA (1 $\mu$ g/ml) **(A)** o IL-1 $\beta$  (2,5 ng/ml) **(B)** durante distintos tiempos y la expresión de miR-146a se determinó por RT-PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \* $p$  <0,05, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. #### $p$  <0,001 FP estimulado respecto B FP. +++ $p$  <0,001 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

Como podemos observar en la figura 46, la expresión de miR-146a en fibroblastos sanos, es inducida de manera tiempo-dependiente con ambos estímulos, siendo los niveles notablemente superiores en los FS estimulados con IL-1 $\beta$ . Sin embargo, no encontramos diferencias significativas, entre fibroblastos sanos y psoriásicos ni a nivel basal ni tras

los correspondientes estímulos. Estos resultados sugieren por lo tanto que la deficiencia de expresión de COX-2 en fibroblastos psoriásicos no está relacionada con una posible alteración de la vía RelB/miR-146a.

2.3.5.2. Vía de señalización CREB

Como se ha comentado anteriormente, CREB es un factor de transcripción nuclear que media la transcripción de genes que contienen un elemento de respuesta a AMPc, como es el caso de COX-2. Por lo tanto, nos planteamos el estudio de una posible alteración a este nivel.



**Figura 47.** Análisis de la activación de CREB. Las células fueron incubadas durante 15min con TPA (1µg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de CREB y ATF-1 fosforiladas por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \**p* <0,05, \*\**p* <0,01 FS estimulados respecto B FS. ##*p* <0,05, ###*p* <0,01 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

En el análisis de Western Blot respecto a la fosforilación de CREB, observamos que en ambos tipos de fibroblastos existe un máximo de activación con el estímulo del TPA respecto a los correspondientes basales (Figura 47). La IL-1β también produce una intensa fosforilación de CREB, aunque ligeramente menor al TPA. En cuanto a la comparación entre FS y

FP, tal y como se muestra en la figura 47, no se aprecian diferencias significativas entre ambas poblaciones celulares para ninguna de las condiciones empleadas, sugiriendo por lo tanto que no existe ninguna alteración a nivel de la activación del factor nuclear CREB.

### 2.3.5.3. Vía de señalización MAPK

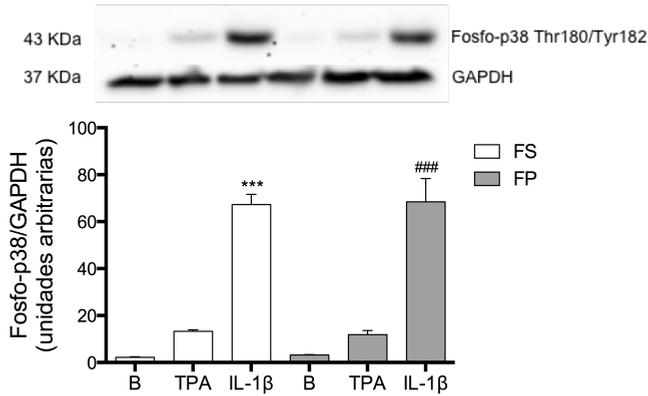
Como hemos comentado en el apartado correspondiente de la introducción, las MAPK más implicadas en la vía de señalización de la COX-2 pertenecen a las familias de la p38, ERK y SAPK/JNK. Por lo tanto, y de manera similar a los ensayos realizados en el apartado anterior a nivel de citocinas, se ha abordado el estudio comparativo de fosforilación de estas cinasas en fibroblastos sanos y psoriásicos.

#### *a) Fosforilación de p38 y ERK1/2*

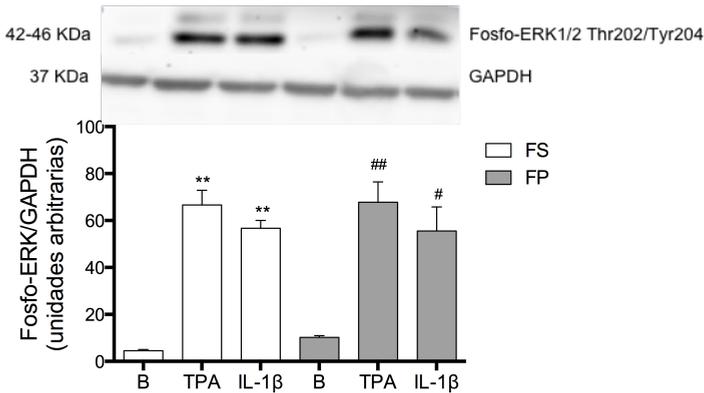
En el análisis de la activación de la p38, se observa un máximo de fosforilación de la cinasa en los fibroblastos estimulados con IL-1 $\beta$ , tanto en fibroblastos sanos como psoriásicos. Por otra parte, el estímulo de TPA escasamente consigue activar a la p38 en comparación con las células no estimuladas (Figura 48). El estudio comparativo entre ambos tipos celulares muestra que no existe diferencia alguna entre los perfiles de activación de esta cinasa entre ambos tipos celulares.

En la figura 49, se muestra como las ERK son activadas tanto por el TPA como por la IL-1 $\beta$ , siendo capaces estos estímulos de activar las dos isoformas de esta MAPK.

Es de destacar que tampoco aparecen diferencias significativas entre las respuestas de fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos.



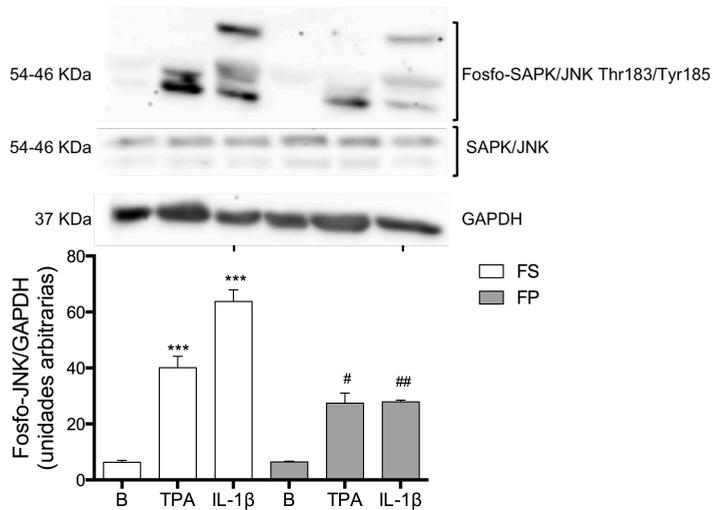
**Figura 48.** Análisis de la activación de p38. Las células fueron incubadas durante 15min con TPA (1µg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml). Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de p38 fosforilada por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\**p* <0,001 FS estimulados respecto B FS. ###*p* <0,001 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.



**Figura 49.** Análisis de la activación de ERK1/2. Las células fueron incubadas durante 15min con TPA (1µg/ml) o IL-1β (2,5 ng/ml). Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de ERK1/2 fosforiladas por densitometría. Los resultados se expresan como media ± SEM (n= 3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\**p* <0,01 FS estimulados respecto B FS. #*p* <0,05, ##*p* <0,01 FP estimulado respecto B FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

b) Fosforilación de SAPK/JNK

La figura 50 muestra el patrón de fosforilación de las SAPK/JNK ante los estímulos en estudio. En los fibroblastos sanos, la IL-1 $\beta$  produce la máxima fosforilación de SAPK/JNK, observándose las bandas correspondientes a las distintas isoformas de la cinasa. Además, el TPA también provoca la fosforilación de SAPK/JNK, si bien es incapaz de activar todas las isoformas de la cinasa, ya que, como se muestra en la imagen, únicamente se observan las bandas inferiores.



**Figura 50.** Análisis de la activación de SAPK/JNK. Las células fueron incubadas durante 15min con TPA (1 $\mu$ g/ml) o IL-1 $\beta$  (2,5 ng/ml). Posteriormente, se llevó a cabo la lisis total celular para realizar el Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y el análisis de la expresión de SAPK/JNK fosforiladas y totales por densitometría. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (3). Test de comparación múltiple de Sidak, \*\*\* $p$  <0,001 FS estimulados respecto B FS. # $p$  <0,05, ## $p$  <0,01 FP estimulado respecto B FP. +++ $p$  <0,001 FS vs FP. B: células no tratadas. FS: Fibroblastos sanos, FP: Fibroblastos psoriásicos.

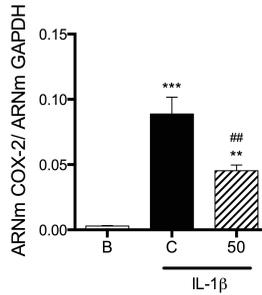
Es de destacar que en los fibroblastos psoriásicos el patrón de fosforilación respecto a los fibroblastos sanos es significativamente menor para ambos estímulos, tanto en los estimulados con TPA como con IL-1 $\beta$ . Al igual que hemos visto anteriormente en los estudios con el estímulo TNF $\alpha$ , esta disminución de la fosforilación de SAPK/JNK no es debida a la menor expresión de la proteína total.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, podemos sugerir que en fibroblastos psoriásicos hay una alteración en la fosforilación de SAPK/JNK que podría ser responsable de la deficiente expresión de COX-2 y la consiguiente generación de PGE<sub>2</sub>.

### **2.3.6. Análisis de la expresión de COX-2 por RT-PCR a tiempo real en presencia del inhibidor de SAPK/JNK**

Como hemos visto que la fosforilación de la vía de SAPK/JNK parece estar afectada en los fibroblastos psoriásicos, nos planteamos estudiar la implicación de esta vía en la expresión de la COX-2. Para ello, hemos realizado un estudio en fibroblastos sanos preincubando durante 30min con el inhibidor de JNK (SP600125) y posteriormente estimulando con IL-1 $\beta$  durante 2h con el fin de analizar por RT-PCR a tiempo real la expresión del ARNm de COX-2

En la figura 51 se muestra como el SP600125 es capaz de disminuir significativamente los niveles de ARNm en los fibroblastos estimulados. Por tanto, observamos una relación directa entre la síntesis de COX-2 y la vía de señalización de JNK que, al estar afectada en los fibroblastos psoriásicos, explicaría el déficit de expresión de la enzima en esta población celular.



**Figura 51.** Expresión génica de COX-2 en fibroblastos sanos en presencia del inhibidor de SAPK/JNK. Las células se preincubaron con SP600125 y posteriormente se incubaron con IL-1 $\beta$  (2,5 ng/ml) durante 2h. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n= 3). *t* de Dunnett \*\*\**p* <0,001 fibroblastos estimulados respecto B. ##*p* <0,01, fibroblastos estimulados respecto C. B: células no tratadas, C: células tratadas con IL-1 $\beta$  (2,5 ng/ml), 50: células tratadas con SP600125 (50  $\mu$ M),

A la vista de todos los resultados obtenidos en la Parte II de la presente Tesis Doctoral, podemos concluir que los fibroblastos psoriásicos presentan una alteración en el patrón de fosforilación de SAPK/JNK que podría ser responsable de la respuesta disminuida frente a diversos estímulos inflamatorios.

## DISCUSIÓN

---



La comprensión de la compleja red de citocinas en la que se basa la inmunopatogénesis de la psoriasis ha llevado a la introducción de las nuevas terapias biológicas dirigidas contra determinadas citocinas, como TNF $\alpha$  e IL-12/IL-23, revolucionando el tratamiento de la psoriasis moderada a grave en el últimos años (Elder y *cols.*, 2010). Sin embargo, a pesar de su eficacia, las terapias biológicas plantean ciertas inquietudes relacionadas con su perfil de seguridad y eficacia tras su uso a largo plazo y el aumento de los riesgos de infección (Ramos-Casals y *cols.*, 2008). Por otra parte, estas terapias no se consideran el tratamiento de elección para la gran mayoría de los pacientes cuya psoriasis no es lo suficientemente grave como para justificar su uso (Williams, 2012). En estos casos, el arsenal terapéutico utilizado por vía tópica incluye los corticoides y los análogos de la vitamina D, los cuales tienen un efecto beneficioso limitado y reacciones adversas conocidas (Guía INFAC; Nast y *cols.*, 2012).

Aunque los importantes avances alcanzados durante la última década han permitido un mejor manejo de la enfermedad psoriásica, todavía son necesarios estudios que permitan entender los factores determinantes de la prognosis de la enfermedad, así como los mecanismos implicados en el amplio espectro de comorbilidades asociadas a esta patología (Ryan y *cols.*, 2014). A este respecto, el estudio de la contribución de las células residentes al agravamiento o incluso a la resolución del proceso inflamatorio característico de esta enfermedad, pueden permitir elucidar factores desencadenantes de las exacerbaciones y recaídas de esta enfermedad recurrente. Así mismo, un mayor entendimiento de los mecanismos de acción de los fármacos utilizados actualmente en la terapéutica de la psoriasis, puede ayudar a establecer nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de nuevas terapias más seguras y eficaces.



## **PARTE I: ESTUDIO DEL EFECTO DE CGS-21680 EN EL MODELO DE HIPERPLASIA EN PIEL DE RATÓN INDUCIDA POR TPA**

Entre los agentes sistémicos empleados para el tratamiento de la psoriasis moderada a severa, el metotrexato (MTX) es un conocido agente inmunosupresor que, aunque no está exento de efectos secundarios, sigue siendo considerado como fármaco de gran utilidad (Warren y cols., 2008). Además de su mecanismo de acción relacionado con la inhibición del metabolismo del ácido fólico, se ha puesto de manifiesto en los últimos años que las propiedades anti-inflamatorias de metotrexato están también mediadas por el aumento de la liberación de adenosina en la zona de inflamación (Chan y Cronstein, 2010). Sin embargo, la contribución de cada uno de los receptores de adenosina conocidos,  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ , todavía no está totalmente establecida. De acuerdo con estudios previos *in vivo* utilizando antagonistas de estos receptores (Cronstein y cols., 1993) y posteriores ensayos con animales knockout, se confirmó el papel fundamental de los receptores  $A_{2A}$  en la supresión de la inflamación ejercida por el metotrexato (Montesinos y cols., 2003; Montesinos y cols., 2006).

Los resultados obtenidos en la presente Tesis han demostrado el efecto beneficioso del agonista selectivo del receptor  $A_{2A}$  de adenosina, CGS-21680 (valores de  $K_i$  para los receptores de roedores son 1800 nM para  $A_1$ , 19 nM para  $A_{2A}$ , > 10000 nM para  $A_{2B}$  y 584 nM para  $A_3$ ) (Liang y cols., 2010) tras su administración tópica en el modelo inflamatorio de hiperplasia de piel inducida por TPA. Macroscópicamente, el agonista del receptor  $A_{2A}$  es capaz de proteger la piel del ratón de las lesiones cutáneas inducidas por la aplicación repetida de TPA, efecto que se correlaciona con la normalización histológica de la epidermis.

La excesiva proliferación de los queratinocitos epidérmicos es una característica típica de enfermedades inflamatorias crónicas de la piel tales como la psoriasis (Perera y cols., 2012) y se puede determinar por la

expresión de CK6 (Blumberg y *cols.*, 2010). El tratamiento con CGS-2168 suprimió no sólo la expresión de esta citoqueratina, sino que también redujo el número de queratinocitos Ki67-positivos, lo que demuestra la inhibición que produce este compuesto sobre la hiperproliferación epidérmica inducida por TPA. En este sentido, se ha descrito el efecto antiproliferativo de la adenosina y sus nucleótidos en los queratinocitos epidérmicos humanos durante los estados patológicos (Cook y *cols.*, 1995; Brown y *cols.*, 2000). Sin embargo, otros investigadores han demostrado que, un agonista de adenosina no selectivo, promueve la proliferación de queratinocitos de ratón, presumiblemente a través de la activación de los receptores  $A_{2B}$  de adenosina (Braun y *cols.*, 2006).

En contraste con el efecto inhibidor de CGS-21680 sobre la hiperproliferación epidérmica, la inmunodetección de Ki67 y la tinción con Sirius Red han puesto de manifiesto el incremento de la proliferación de fibroblastos dérmicos y el aumento de las fibras de colágeno, después de la aplicación de este agonista. Este efecto está en concordancia con estudios previos que indican que los agonistas del receptor  $A_{2A}$  promueven la proliferación de fibroblastos dérmicos (Montesinos y *cols.*, 1997) y la síntesis de colágeno de matriz, principalmente colágeno de tipo 1 y 3 (Perez-Aso y *cols.*, 2013). En este sentido, observaciones anteriores en ratones deficientes del receptor  $A_{2A}$  de adenosina, mostraron una reducción en la formación de tejido de granulación durante la curación de heridas cutáneas (Valls y *cols.*, 2009). Curiosamente, a pesar de los defectos en la celularidad y la deposición de matriz extracelular del tejido de granulación, la reepitelización no se vio comprometida en estos ratones deficientes en el receptor  $A_{2A}$ , lo que podría deberse a que en la epidermis, el receptor mayoritario es el  $A_{2B}$  (Brown y *cols.*, 2000; Braun y *cols.*, 2006).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren pues un papel protector de los receptores  $A_{2A}$  de adenosina en la piel, regulando por una parte la hiperproliferación epidérmica y preservando al mismo tiempo la integridad de la dermis. Estos efectos serían claramente beneficiosos en

comparación con el conocido efecto atrófico del compuesto de referencia dexametasona, cuya administración en periodos largos aún constituye un modelo de deterioro en la cicatrización de heridas en ratones (Braun y *cols.*, 2006).

La activación del receptor  $A_{2A}$  juega un papel clave en la regulación de la inflamación por la adenosina, debido a la inhibición de los mediadores inflamatorios liberados por los leucocitos y las células endoteliales y la inhibición de la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular, disminuyendo por lo tanto la infiltración celular (Haskó y Cronstein, 2013). En el presente estudio, la reducción de la migración de leucocitos en la piel después del tratamiento con CGS-21680 se ha confirmado por el análisis histológico de las secciones teñidas con eosina-hematoxilina. La inhibición tanto de los factores quimiotácticos CXCL-1 y  $LTB_4$  como de la actividad MPO, observados en los homogenados de la piel tratada con el agonista, corrobora la inhibición del reclutamiento de neutrófilos, que constituyen el tipo de célula infiltrante predominante en el modelo de hiperplasia inducida por TPA (Ikai, 1999; Sato y *cols.*, 2004; Cataisson y *cols.*, 2005). De la misma manera, un estudio con pacientes psoriásicos mostró que el tratamiento con metotrexato causó la supresión de las moléculas de adhesión tanto leucocitarias como vasculares, previendo así la egresión de los leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la piel (Sigmundsdottir y *cols.*, 2004). Este efecto podría ser debido a un aumento de los niveles de adenosina provocadas por MTX.

Nuestros resultados sugieren que la aplicación tópica de agonistas  $A_{2A}$  sobre la piel podría bloquear las primeras etapas del proceso inflamatorio mediante la inhibición de la activación epidérmica dependiente de neutrófilos. En este sentido, se ha descrito que la adenosina, actuando principalmente en los receptores  $A_{2A}$ , disminuye la producción de radicales de oxígeno y otros mediadores potencialmente deletéreos por los neutrófilos activados (Burnstock y *cols.*, 2012; Haskó y Cronstein, 2013).

Es de destacar que uno de los eventos principales en el desarrollo de las lesiones psoriásicas es la acumulación perivascular de neutrófilos y su afluencia en la epidermis (Bos y *cols.*, 2005). En estas etapas preliminares, sus reacciones fagocíticas causan daño oxidativo que inicia la expresión de factores de transcripción sensibles a redox, tales como NF- $\kappa$ B (Briganti y Picardo, 2003). La actividad transcripcional de este factor nuclear se inicia con la fosforilación y translocación al núcleo de la subunidad p65, y controla la expresión de numerosos genes, incluyendo los de citocinas, como TNF- $\alpha$ , quimiocinas y factores de crecimiento que están implicados en la respuesta inflamatoria (Perera y *cols.*, 2012). En el presente estudio, la estimulación del receptor A<sub>2A</sub> por CGS-21680 fue capaz de suprimir la fosforilación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en la piel de ratón. Este efecto podría estar relacionado con la reducción de la migración de neutrófilos en respuesta a la activación del receptor A<sub>2A</sub> según lo sugerido por algunos autores (Säve y *cols.*, 2011), o más interesante, con la inhibición de la producción de moléculas quimiotácticas por los queratinocitos mediadas por la activación de NF- $\kappa$ B (Cataisson y *cols.*, 2005).

Consistentemente con el efecto inhibitor sobre la activación de NF- $\kappa$ B, la aplicación de CGS-2168 también ha inhibido la liberación de TNF- $\alpha$  en la piel tratada con TPA. Varios estudios están de acuerdo en que el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina es el receptor primario y dominante que media la inhibición de TNF- $\alpha$  en varios tipos de células (Hasko y *cols.*, 2008). Por lo tanto, la inhibición tanto de la activación de NF- $\kappa$ B como de la liberación de TNF- $\alpha$  podría evitar la activación del bucle proinflamatorio de retroalimentación positiva producido por TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B en la piel psoriásica. De manera similar, se ha descrito que el CGS-21680 reduce la progresión de la artritis inducida por colágeno murino tipo II (CIA) (Mazzon y *cols.*, 2011) y aminora la artritis inducida por adyuvante en ratas (Vincenzi y *cols.*, 2013), modelos animales aceptados de artritis reumatoide, que también se caracterizan por el aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  y la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B.

En resumen, nuestros resultados muestran que la aplicación tópica de CGS-2168 en piel de ratón reduce la hiperplasia epidérmica, así como la inflamación de la piel por la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B, la infiltración de leucocitos, y la generación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, de manera similar a la del agente sistémico metotrexato y los corticoides tópicos. Además, el incremento de la proliferación de fibroblastos dérmicos y el aumento de la producción de colágeno corroboran el papel beneficioso y protector del CGS-2168 en la dermis, mostrando una clara ventaja sobre los corticosteroides tópicos que causan atrofia de la piel después de su uso continuado. Por lo tanto, la administración tópica de agonistas del receptor  $A_{2A}$  podría presentar aplicaciones potenciales en relación con el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel caracterizadas por hiperproliferación epidérmica, tales como la psoriasis.



## **PARTE II: MEDIADORES INFLAMATORIOS EN FIBROBLASTOS SANOS Y PSORIÁSICOS**

La psoriasis es una patología de la piel en la que están implicados numerosos tipos celulares, como ya se ha indicado en la introducción. Sin embargo, los fibroblastos, el tipo celular principal en la dermis, generalmente han sido poco estudiados en psoriasis debido a que tradicionalmente se han considerado como células de sostén que únicamente cumplen funciones de síntesis y remodelación de la matriz extracelular, y en segundo lugar, a que la principal alteración observada en la dermis de las lesiones psoriásicas es una hipervascularización aberrante. Contrariamente, este tipo celular es utilizado extensamente en estudios de reparación tisular, dada su participación en el mantenimiento de la homeostasia y la generación del tejido de granulación durante la curación de heridas (Valls y cols., 2009).

Los fibroblastos son células que también actúan como células del sistema inmunitario y algunos autores sugieren que podrían estar implicados en el desarrollo y cronificación de la respuesta inflamatoria en determinadas patologías, como la artritis reumatoide o la psoriasis, a través de la liberación de citocinas y otros mediadores que favorecen la infiltración leucocitaria y la interacción entre distintos tipos celulares (Buckley, 2011; Naylor y cols., 2013). Por tanto, uno de los objetivos de la presente tesis doctoral ha sido el estudio comparativo entre fibroblastos obtenidos de pacientes diagnosticados de psoriasis y fibroblastos procedentes de donantes sanos. Para ello, inicialmente hemos incubado ambos tipos de células con distintos agentes inflamatorios, determinando tanto las posibles diferencias en cuanto a proliferación y viabilidad celular, como respecto a la liberación de IL-6, IL-8 (citocinas implicadas en la patogénesis de la enfermedad) y PGE<sub>2</sub> (metabolito principal de la COX-2 que es producido mayoritariamente por este tipo celular).

Tras el proceso de aislamiento y purificación, se obtuvieron cultivos homogéneos de fibroblastos en ambos casos, con crecimiento en monocapa y morfología similar que fue confirmada por inmunodetección de vimentina para una mejor identificación de este tipo celular. Esta proteína es característica de células fibroblásticas/mesenquimales y es el marcador más comumente empleado en la caracterización de fibroblastos, tanto en cultivos celulares como en secciones histológicas (Kokkinos y *cols.*, 2007; Driskell y *cols.*, 2013). Además, en el ensayo de viabilidad celular se descartó la posible citotoxicidad de los estímulos ensayados. Estos resultados están en concordancia con otros estudios reflejados en la bibliografía, en los que tampoco se observa diferencias en cuanto al crecimiento celular y ratio de proliferación entre fibroblastos normales y psoriásicos (Debets y *cols.*, 1996a).

Respecto a los estímulos empleados, se ha elegido en primer lugar el TNF $\alpha$  debido a su clara implicación en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la psoriasis (Bos y *cols.*, 2005). Esta citocina, liberada por distintos tipos celulares, crea una cascada de activación que amplifica y mantiene la respuesta inflamatoria en la placa psoriásica vía activación del NF- $\kappa$ B (Buckley y *cols.*, 2001). Se ha empleado también IL-1 $\beta$  como estímulo celular, ya que es una citocina altamente secretada por los queratinocitos en procesos inflamatorios (Feldmeyer y *cols.*, 2007) que actúa como potente inductor de citocinas y COX-2 en fibroblastos (Georganas y *cols.*, 2000; Dinarello, 2002; Sakaki y *cols.*, 2004). Esta citocina, a través de su receptor específico de membrana, activa a las MAPK y a diferentes factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B y AP-1, implicados en la producción de IL-6 e IL-8, entre otros mediadores (Suzuki y *cols.*, 2000; Hagemann y Blank, 2001; Symons y *cols.*, 2006).

Por último, el TPA es un activador directo de varias isoformas de PKC, enzimas implicadas principalmente en la señalización celular tras varios estímulos, que promueven la proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares (Rosse y *cols.*, 2010). Como hemos visto en la primera parte de

esta tesis doctoral, numerosos estudios *in vivo* muestran que la aplicación tópica repetida de TPA sobre la piel de ratón reproduce algunos de los signos característicos de la psoriasis como son la hiperplasia de la epidermis y el aumento de la infiltración leucocitaria (Reynolds *y cols.*, 1997; Sato *y cols.*, 2004).

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que tanto en fibroblastos sanos como psoriásicos, la IL-1 $\beta$  es el estímulo que produce niveles superiores de IL-6 e IL-8. Sin embargo, se observa que el aumento de ambas citocinas tiende a ser menor en los fibroblastos psoriásicos, si bien los resultados no llegan a ser significativos para IL-6. Este defecto ha sido más evidente al estimular los fibroblastos psoriásicos con TNF $\alpha$ , ya que los niveles de IL-6 e IL-8 generados tras 24 horas de estímulo fueron significativamente menores que los producidos por células sanas. Esta respuesta disminuida al TNF $\alpha$  podría deberse a la menor expresión de los receptores TNFR1 en fibroblastos psoriásicos respecto a los fibroblastos normales (Debets *y cols.*, 1996b). Sin embargo, en el estudio tiempo-dependiente realizado, observamos que a tiempos más cortos de estímulo, entre 6 y 9 horas, TNF $\alpha$  induce niveles de IL-8 similares en fibroblastos psoriásicos y sanos, lo cual parece indicar que los fibroblastos psoriásicos mantienen la capacidad de respuesta. En cambio, observamos que los niveles de IL-6 secretados por los fibroblastos psoriásicos son menores incluso en condiciones basales y apenas se ven inducidos por el estímulo con TNF $\alpha$ .

Dadas las diferencias en la secreción de citocinas inducidas por TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en fibroblastos psoriásicos, utilizamos como estímulo el TPA, cuyo efecto es independiente de receptores. En los fibroblastos sanos, el TPA produce un menor aumento de la liberación de IL-8 e IL-6 que los otros estímulos ensayados TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . Estos resultados parecen indicar que la activación de la PKC a través del TPA en fibroblastos no es tan determinante en la producción de las citocinas proinflamatorias. Es de destacar que los fibroblastos psoriásicos no produjeron niveles apreciables

de IL-8 e IL-6 con este estímulo, lo que indica que la actividad PKC en fibroblastos psoriásicos podría estar alterada tal y como apuntan otros autores (Nagao y *cols.*, 1988; Raynaud y Evain-Brion, 1991). En este sentido, se sabe que los fibroblastos dérmicos expresan tres diferentes isoenzimas de la PKC ( $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) y que tanto la isoenzima  $\alpha$  como la  $\delta$  son reguladas a la baja por TPA, pudiendo modular en determinados casos el efecto final sobre la liberación de citocinas proinflamatorias (Zhang y *cols.*, 1992). Sería por lo tanto interesante investigar la implicación de las diversas isoenzimas de la PKC en la liberación de estas citocinas y su posible diferente expresión en estados patológicos.

Por otra parte, es conocida la capacidad del TNF $\alpha$  para inducir la COX-2 y estimular la síntesis de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos dérmicos humanos (Nakao y *cols.*, 2002). Este efecto ha sido corroborado en el presente estudio, ya que hemos observado que el TNF $\alpha$  produce un aumento de la liberación de dicho eicosanoide tras 24h de estimulación. Un efecto similar se ha descrito para el TPA, que también activa la COX-2 en fibroblastos por activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Nakao y Inoue, 2009). No obstante, con ambos estímulos, la eficiencia de la unión de este factor de transcripción al gen que codifica la COX-2 es menor que cuando se emplean otros estímulos como IL-1 $\beta$  (Debets y *cols.*, 1996; Nakao y Inoue, 2009). De hecho, ha sido descrito que la transcripción de la COX-2 mediada por IL-1 $\beta$  en fibroblastos es regulada por diversas vías de señalización mediadas por MAPK, CREB o NF- $\kappa$ B (Tsatsanis y *cols.*, 2006; Nakao y Inoue, 2009; Garcia-Garcia y *cols.*, 2012), produciendo una marcada producción de PGE<sub>2</sub>.

Respecto a los fibroblastos procedentes de pacientes psoriásicos, es importante destacar que ninguno de los estímulos ensayados ha conseguido producir niveles significativos de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes celulares. Este resultado marca una notable e interesante diferencia entre los fibroblastos dérmicos psoriásicos, y los fibroblastos aislados en otras patologías inflamatorias crónicas como artritis reumatoide, enfermedad de

Graves o cáncer de colon, en las que tanto PGE<sub>2</sub> como diversas citocinas proinflamatorias participan en la amplificación y cronificación de estas patologías (Smith, 2005; Kunisch y *cols.*, 2009; Paulissen y *cols.*, 2013).

El papel de la PGE<sub>2</sub> en la psoriasis siempre ha ido acompañado de gran controversia y podría deberse en parte a la distinta función pro/antiinflamatoria ejercida por sus 4 receptores (EP1, EP2, EP3 y EP4). Además, la distribución de estos receptores en las células difiere de la distribución de las sintasas específicas de prostanoïdes. Así, mientras que los receptores están expresados tanto en células de la inmunidad innata (APC) como adaptativa (linfocitos T y B), las sintasas están expresadas principalmente en las células inflamatorias (fagocitos) pero no en linfocitos T y B. Por lo tanto, las células de la inmunidad innata estimuladas producen prostanoïdes que a su vez pueden modular su función de una manera autocrina y regular la inmunidad adaptativa de una manera paracrina (Harizi y Gualde, 2005).

Nuestros resultados también contrastan con estudios recientes que sugieren que el aumento de la expresión de COX-2 en fibroblastos, vía secreción de PGE<sub>2</sub> está involucrado en la perpetuación de la respuesta inmune en la psoriasis. Así, PGE<sub>2</sub> promueve la secreción de IL-23 en las células dendríticas y consecuentemente la expansión de las células Th17 (Schirmer y *cols.*, 2010), y aumenta la secreción de metaloproteinasas (MMP-9) en células dendríticas, estimulando su migración, aunque se necesitan concentraciones 100 veces superiores a las que se encuentran en los sobrenadantes de fibroblastos para producir este efecto (Saalbach y *cols.*, 2010).

Por el contrario, otros estudios sugieren que la PGE<sub>2</sub> puede presentar efecto antiinflamatorio en determinadas condiciones, pudiendo suprimir incluso la producción de citocinas proinflamatorias a partir de las células dendríticas (Shiraishi y *cols.*, 2008) y alterando el proceso de diferenciación de este tipo celular (Kalinski y *cols.*, 1997). En este sentido, se ha demostrado recientemente que las células dendríticas resultantes tras la

estimulación con PGE<sub>2</sub> durante su diferenciación son capaces de suprimir la acción de los linfocitos T citotóxicos (Obermajer y *cols.*, 2011). Además, este eicosanoide liberado por los fibroblastos también podría controlar la inflamación mediada por células T en la piel mediante la activación de los receptores EP2 y EP3 de queratinocitos psoriásicos, inhibiendo la producción de la quimiocina CCL-27 (Kanda y *cols.*, 2004). Asimismo, la PGE<sub>2</sub> también inhibe directamente la producción de IL-2 por células T y la respuesta a esta citocina, suprimiendo de esta manera la activación y la expansión de las células T antígeno-específicas (Rincon y *cols.*, 1988).

El estudio comparativo de la liberación de mediadores inflamatorios por fibroblastos procedentes de lesiones psoriásicas y los procedentes de donantes sanos, muestra que existen diferencias notables entre ambos tipos celulares, pero que a su vez dependen también del estímulo empleado y el mediador determinado. En concreto, se observa que los fibroblastos psoriásicos presentan una capacidad menor para producir PGE<sub>2</sub>, independientemente del estímulo empleado, e incluso en condiciones basales, lo que se correspondería con un fenotipo hiporeactivo. Sin embargo, la producción de IL-6 por fibroblastos psoriásicos varía de forma importante según el estímulo utilizado, obteniéndose una respuesta similar a los fibroblastos normales cuando se estimulan con IL-1 $\beta$ , mientras que apenas se induce cuando se estimulan con TNF $\alpha$ . A su vez, TNF $\alpha$  induce la producción de IL-8 tras 9h de estímulo tanto en fibroblastos psoriásicos como en los normales, aunque los niveles obtenidos tras 24h de estímulo son mucho menores en fibroblastos psoriásicos. Estos resultados, junto con la absoluta falta de respuesta frente al TPA observada en los fibroblastos psoriásicos, sugieren que las vías de señalización implicadas en la producción de mediadores inflamatorios pudieran verse afectadas.

Como ya se indicó en apartados anteriores, la vía de señalización del NF-kB es crucial para la producción de los mediadores inflamatorios determinados en nuestro estudio (Hayden y Ghosh, 2011; Buckley y *cols.*, 2001). Observamos que en los fibroblastos psoriásicos esta vía no está

alterada, pues no se obtuvieron diferencias entre ambos tipos celulares en cuanto a la fosforilación de la subunidad p65, paso considerado crucial en la activación y translocación al núcleo de este factor de transcripción (Zhong y cols., 2002).

El hecho de que la activación de NF- $\kappa$ B no parecía estar afectada en fibroblastos psoriásicos, nos llevó a pensar en la posibilidad de otro factor crucial en el desarrollo de la patología psoriásica, como es el STAT3. Este factor fue inicialmente identificado como un factor de transcripción dependiente de la IL-6 que promueve la expresión de genes en la fase aguda de la inflamación (Aggarwal y cols., 2009). Hoy en día se conoce que STAT3 integra las respuestas de gran cantidad de mediadores inflamatorios entre los que se encuentran las citocinas de la familia de la IL-6. En respuesta al estímulo, dos monómeros de STAT3 se dimerizan al ser fosforilados por Jak en un residuo de tirosina. El dímero STAT3 fosforilado se desplaza al núcleo donde regulará la transcripción de distintos genes (Levy y Darnell, 2002).

La fosforilación del residuo de Tyr705 del factor de transcripción STAT3 inducida por IL-6 en los fibroblastos psoriásicos no está alterada respecto a los fibroblastos normales, lo cual indica que la respuesta de los fibroblastos psoriásicos a las citocinas de la familia de la IL-6 no está comprometida. Sin embargo, hemos encontrado diferencias en la fosforilación del residuo de Ser727 de STAT3 entre fibroblastos sanos y fibroblastos psoriásicos al ser estimulados con TNF $\alpha$ .

La importancia biológica de la fosforilación en el residuo Ser727 de STAT3 es todavía objeto de debate (Decker y Kovarik, 2000; Reich, 2009). Algunos estudios la han relacionado con una localización mitocondrial de STAT3, donde aumenta la oxidación promoviendo la transformación celular por el oncogén Ras (Reich, 2009). Además, varios estudios han demostrado un incremento en los niveles de STAT3 fosforilado (pSTAT3) en Ser727 en las etapas tempranas de formación de diferentes tipos de tumores (Aziz y

*cols.*, 2010; Tkach y *cols.*, 2013). Recientemente, Sakaguchi y *cols.*, 2012 han demostrado un aumento de la fosforilación en Ser727 en células de melanoma, donde provoca la translocación al núcleo de STAT3, confiriendo resistencia frente a la apoptosis, independientemente de la fosforilación en Tyr705.

Puesto que el residuo aminoacídico Ser727 del STAT3 forma parte de una secuencia consenso diana para MAPK (Decker y Kovarik, 2000), decidimos estudiar las diferencias de activación de las distintas MAPK en ambos grupos de células. Como muestran nuestros resultados, el estímulo con TNF $\alpha$  promueve la fosforilación de ERK1/2 y p38 de forma similar en fibroblastos sanos y psoriásicos, mientras que la fosforilación de JNK está disminuída en fibroblastos psoriásicos. El estímulo con IL-6, el cual promovió la fosforilación del residuo de Tyr705 de STAT3 de forma similar en fibroblastos psoriásicos y normales, no produjo cambios apreciables en la fosforilación de ninguna de las MAPK ensayadas, sugiriendo que no participan en la modulación de la fosforilación del residuo de Tyr705 mediada por las Jak (Levy y Darnell, 2002).

Mediante el empleo de inhibidores selectivos de MAPK, identificamos que la alteración en la fosforilación de JNK en fibroblastos psoriásicos es causa directa de la baja fosforilación del residuo Ser727 de STAT3. Es más, el inhibidor de la actividad de p38 produce el aumento tanto en la fosforilación de JNK como en el residuo Ser727 de STAT3, lo que aún parece reforzar dicha relación, tal como se ha descrito en otros tipos celulares (Guo y Xie, 2005). En este sentido, el residuo Ser727 de STAT3 es crucial en la actividad transcripcional de STAT3 (Decker y Kovarik, 2000). Así, una disminución en su fosforilación ocasionaría una eficacia transcripcional mermada de STAT3.

La familia SAPK/JNK está formada por un conjunto de isoenzimas que al fosforilarse actúan modificando la actividad de diversas proteínas diana. En la presente tesis hemos identificado STAT3 como una de ellas, pero existen otros sustratos de esta cinasa bien conocidos, como c-Jun. Una vez

c-Jun es fosforilada por JNK se desplaza al núcleo donde forma parte del factor de transcripción AP-1. Diversos genes, como el de COX-2, IL-6 e IL-8 presentan lugares de unión para AP-1 en su promotor, por lo tanto, una fosforilación disminuida de JNK se traducirá en una expresión debilitada de estos genes (Allport y *cols.*, 2000; Beetz y *cols.*, 2000; Hoffmann y *cols.*, 2002; Xiao y *cols.*, 2004; Kim y *cols.*, 2009; Khanjani y *cols.*, 2012). Nuestros resultados con inhibidores selectivos de JNK confirman que esta vía está implicada en la producción de IL-6 e IL-8, así como en la inducción de COX-2 por fibroblastos dérmicos.

Asimismo, recientemente se ha puesto de manifiesto el papel fundamental que desempeñan los factores solubles dependientes de JNK secretados por fibroblastos dérmicos en la diferenciación y proliferación de queratinocitos. En este sentido, el proceso natural de diferenciación de los queratinocitos se ve seriamente comprometido cuando el fibroblasto dérmico presenta alteraciones en esta vía de señalización (Schumacher y *cols.*, 2014). Así pues, la deficiencia en la activación de la vía JNK observada en los fibroblastos psoriásicos podría ser un factor determinante de la renovación epidérmica incrementada que caracteriza esta enfermedad.

El fibroblasto es una célula plástica (Eyden, 2004), capaz de modificar su fenotipo en distintas patologías. En cáncer, por ejemplo, los fibroblastos asociados al tumor (CAF) sufren un cambio fenotípico que resulta vital en la supervivencia del tumor, contribuyendo a la formación de un microambiente propicio para su desarrollo (Cirri y Chiarugi, 2011; Chen y *cols.*, 2013). En este sentido, en determinados tipos de cánceres, como el de colon, mama y próstata, los CAF expresan intensamente la COX-2 y secretan grandes cantidades de PGE<sub>2</sub> (Kalluri y Zeisberg, 2006; Xing y *cols.*, 2010), muy implicados en la generación de este microambiente.

En otras patologías, como la fibrosis pulmonar idiopática, los fibroblastos son incapaces de expresar COX-2 y, por lo tanto, producir PGE<sub>2</sub>, lo cual podría estar muy implicado en la patogénesis de esta

enfermedad (Coward y cols., 2009). Diversos autores apuntan a que este fallo en la síntesis de COX-2 podría deberse a una alteración en la vía no canónica del complejo transcripcional NF- $\kappa$ B de estos fibroblastos (McMillan y cols., 2013; Zago y cols., 2014). Así, se ha visto que la sobreexpresión de la subunidad RelB, encargada de regular el miR-146a, produciría la degradación del ARNm de COX-2 y de otras citocinas inflamatorias, como IL-6. Con esta evidencia, decidimos estudiar la expresión de RelB y miR-146a en los fibroblastos psoriásicos y los fibroblastos sanos. Sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión de RelB ni de miR-146a entre ambos grupos de células, por lo que estas vías no parecen estar implicadas en la producción disminuída de IL-6 e IL-8 y el fallo en la inducción de COX-2.

Por último, también hay que tener en cuenta el importante papel que juegan los prostanoides en la fase de resolución de la inflamación (Scher y Pillinger, 2009). A la vista de nuestros resultados podríamos pensar que la PGE<sub>2</sub> posee una función autorreguladora en los fibroblastos sanos que se pierde en los fibroblastos psoriásicos y que podría contribuir a la falta de control de la infiltración celular característica de la patología psoriásica. Además, no debemos olvidar que existen otros metabolitos producidos por la COX-2, como PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y PGD<sub>2</sub>, con funciones fisiológicas diversas, que tampoco serían liberados en la lesión psoriásica por los fibroblastos dérmicos, contribuyendo aún más en la alteración del proceso normal inflamatorio (Scher y Pillinger, 2009). A favor de esta hipótesis, es necesario mencionar que existen diversos casos clínicos en los que se refiere una exacerbación de la psoriasis tras la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como indometacina y fenilbutazona, aunque el uso de AINE no suele desaconsejarse por los dermatólogos en pacientes de psoriasis (Basavaraj y cols., 2010). Incluso, existe un ensayo en el que la aplicación de un gel de PGE<sub>2</sub> mejoraba las lesiones psoriáticas (Remy y cols., 1986).

Nuestros resultados, unidos al hecho de que otros tipos celulares que se muestran alterados en psoriasis, como los queratinocitos, se comportan de manera similar a aquellos provenientes de pacientes sanos ante condiciones inflamatorias *in vitro* (Takahashi y cols., 2009), sugieren que el fibroblasto dérmico podría estar verdaderamente implicado en la patogénesis de la psoriasis. Así, nuestro trabajo muestra que existe un cambio de fenotipo sufrido por los fibroblastos que podría deberse tanto a la exposición continuada a un entorno inflamatorio, como ocurre en psoriasis, como a un defecto de base que le impediría participar activamente en el control de cualquier proceso inflamatorio, provocando, de esta manera, la exacerbación y cronificación de dicho proceso. No obstante, el hecho de que el fibroblasto dérmico sea incapaz de revertir dicho fenotipo *in vitro* podría traducirse en una dermis dañada e hipoactiva. Así pues, se vería mermada la capacidad de resolver correctamente cualquier agresión efectuada sobre el tejido aún durante los periodos de remisión de la enfermedad psoriásica, pudiendo desempeñar el fibroblasto un papel importante en las recaídas tras la exposición a factores desencadenantes.



# CONCLUSIONES

---



- 1- La aplicación tópica de agonistas selectivos del receptor  $A_{2A}$  presenta un interesante perfil farmacológico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel caracterizadas por hiperproliferación epidérmica, como la psoriasis, pues CGS-21680 reduce la hiperproliferación epidérmica, la inflamación y el infiltrado leucocitario en el modelo de hiperplasia en piel de ratón inducida por TPA, promoviendo la síntesis de colágeno en dermis.
- 2- Aunque no se aprecian diferencias significativas en el ratio de proliferación celular, los fibroblastos procedentes de lesiones psoriásicas presentan una liberación de IL-6 e IL-8 disminuida respecto a los fibroblastos sanos.
- 3- Los fibroblastos psoriásicos son incapaces de producir niveles significativos de  $PGE_2$  tras su estimulación, siendo también la expresión de COX1/COX-2 notablemente inferior a los fibroblastos sanos.
- 4- La activación disminuida de la vía de señalización SAPK/JNK hallada en fibroblastos psoriásicos está implicada en la menor capacidad de fosforilación en el residuo de Ser727 de STAT3 y en la disminución de todos los parámetros inflamatorios estudiados.



# BIBLIOGRAFÍA

---



Aaronson DS, Horvath CM. (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 1653-5.

Aggarwal BB, Kunnammakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B. (2009) Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 1171, 59-76.

Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, Daniele R, Bosisio D, Madonna S, Fortugno P, Gonzalvo-Feo S, Franssen JD, Parmentier M, De Pita O, Girolomoni G, Sozzani S. (2009) Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med* 206, 249-58.

Allport VC, Slater DM, Newton R, Bennett PR. (2000) NF-kappaB and AP-1 are required for cyclo-oxygenase 2 gene expression in amnion epithelial cell line (WISH). *Mol Hum Reprod* 6, 561-5.

Amigo M, Paya M, De Rosa S, Terencio MC. (2007) Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in mouse skin. *Br J Pharmacol* 152, 353-65.

Andres RM, Montesinos MC, Navalon P, Paya M, Terencio MC. (2013) NF-kappaB and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: in vitro and in vivo effects of BTH. *J Invest Dermatol* 133, 2362-71.

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Hasko G. (2013) Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* 13, 842-57.

Aziz MH, Hafeez BB, Sand JM, Pierce DB, Aziz SW, Dreckschmidt NE, Verma AK. (2010) Protein kinase C varepsilon mediates Stat3 Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene* 29, 3100-9.

Bage T, Lindberg J, Lundeberg J, Modeer T, Yucel-Lindberg T. (2010) Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGES-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts. *BMC Genomics* 11, 241.

Bangert CA, Costner MI. (2007) Methotrexate in dermatology. *Dermatol Ther* 20, 216-28.

Basavaraj KH, Navya MA, Rashmi R. (2011) Stress and quality of life in psoriasis: an update. *Int J Dermatol* 50, 783-92.

Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. (2010) The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol* 49, 1351-61.

Beetz A, Peter RU, Ooppel T, Kaffenberger W, Rupec RA, Meyer M, van Beuningen D, Kind P, Messer G. (2000) NF-kappaB and AP-1 are responsible for inducibility of the IL-6 promoter by ionizing radiation in HeLa cells. *Int J Radiat Biol* 76, 1443-53.

Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. (2009) Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol* 215-69.

Blumberg H, Dinh H, Dean C, Trueblood ES, Bailey K, Shows D, Bhagavathula N, Aslam MN, Varani J, Towne JE, Sims JE. (2010) IL-1RL2 and Its Ligands Contribute to the Cytokine Network in Psoriasis. *J Immunol* 185, 4354-62.

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. (1988) Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro* 2, 1-6.

Bos JD, de Rie MA, Teunissen MB, Piskin G. (2005) Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol* 152, 1098-107.

Bosetti F, Rintala J, Seemann R, Rosenberger TA, Contreras MA, Rapoport SI, Chang MC. (2002) Chronic lithium downregulates cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E(2) concentration in rat brain. *Mol Psychiatry* 7, 845-50.

Bowcock AM, Krueger JG. (2005) Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 5, 699-711.

Bradley JR. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214, 149-60.

Braun M, Lelieur K, Kietzmann M. (2006) Purinergic substances promote murine keratinocyte proliferation and enhance impaired wound healing in mice. *Wound Repair Regen* 14, 152-61.

Briganti S, Picardo M. (2003) Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17, 663-9.

Brown JR, Cornell K, Cook PW. (2000) Adenosine- and Adenine-Nucleotide-Mediated Inhibition of Normal and Transformed Keratinocyte Proliferation is Dependent upon Dipyridamole-Sensitive Adenosine Transport. *J Invest Dermatol* 115, 849-59.

Buckley CD. (2011) Why does chronic inflammation persist: An unexpected role for fibroblasts. *Immunol Lett* 138, 12-4.

Buckley CD, Filer A, Haworth O, Parsonage G, Salmon M. (2004) Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2, ii92-ii5.

Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. (2001) Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 22, 199-204.

Burnstock G, Knight GE, Greig AV. (2012) Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. *J Invest Dermatol* 132, 526–46.

Cantini F, Niccoli L, Nannini C, Kaloudi O, Bertoni M, Cassara E. (2010) Psoriatic arthritis: a systematic review. *Int J Rheum Dis* 13, 300-17.

Capon F, Burden AD, Trembath RC, Barker JN. (2012) Psoriasis and other complex trait dermatoses: from Loci to functional pathways. *J Invest Dermatol* 132, 915-22.

Cargnello M, Roux PP. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.

Cataisson C, Pearson AJ, Torgerson S, Nedospasov SA, Yuspa SH. (2005) Protein kinase C alpha-mediated chemotaxis of neutrophils requires NF-kappa B activity but is independent of TNF alpha signaling in mouse skin in vivo. *J Immunol* 174, 1686-92.

Chan ES, Cronstein BN. (2010) Methotrexate--how does it really work? *Nat Rev Rheumatol* 6, 175-8.

Chan ES, Liu H, Fernandez P, Luna A, Perez-Aso M, Bujor AM, Trojanowska M, Cronstein BN. (2013) Adenosine A2A receptors promote collagen production by a Fli1- and CTGF-mediated mechanism. *Arthritis Res Ther* 15, R58.

Chen FG, Zhang WJ, Bi D, Liu W, Wei X, Chen FF, Zhu L, Cui L, Cao Y. (2007) Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci* 120, 2875-83.

Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. (2013) Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 12, 265-86.

Chen SF, Nieh S, Jao SW, Wu MZ, Liu CL, Chang YC, Lin YS. (2013) The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 231, 180-9.

Chong HT, Kopecki Z, Cowin AJ. (2013) Lifting the silver flakes: the pathogenesis and management of chronic plaque psoriasis. *Biomed Res Int* 2013, 168321.

Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. (1997) STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17, 6508-16.

Cirri P, Chiarugi P. (2011) Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 1, 482-97.

Cook PW, Ashton NM, Pittelkow MR. (1995) Adenosine and adenine nucleotides inhibit the autonomous and epidermal growth factor-mediated proliferation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 104, 976-81.

Costa C, Incio J, Soares R. (2007) Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10, 149-66.

Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L. (2009) Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol* 29, 4325-39.

Cronstein BN, Naime D, Ostad E. (1993) The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 92, 2675-82.

Crow JM. (2012) Therapeutics: Silencing psoriasis. *Nature* 492, S58-9.

Cumberbatch M, Singh M, Dearman RJ, Young HS, Kimber I, Griffiths CE. (2006) Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. *J Exp Med* 203, 953-60.

Dauden E, Herrera E, Puig L, Sanchez-Carazo JL, Toribio J, Caloto MT, Nocea G, Roset M, Lara N. (2012) Validation of a new tool to assess health-related quality of life in psoriasis: the PSO-LIFE questionnaire. *Health Qual Life Outcomes* 10, 56.

Davidovici BB, Sattar N, Prinz J, Puig L, Emery P, Barker JN, van de Kerkhof P, Stahle M, Nestle FO, Girolomoni G, Krueger JG. (2010) Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J Invest Dermatol* 130, 1785-96.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. (1989) Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 335-41.

Debets R, Hegmans JP, Buurman WA, Benner R, Prens EP. (1996b) Expression of cytokines and their receptors by psoriatic fibroblasts. II. decreased TNF receptor expression. *Cytokine* 8, 80-8.

Debets R, Hegmans JP, Deleuran M, Hooft S, Benner R, Prens EP. (1996a) Expression of cytokines and their receptors by psoriatic fibroblast. I. Altered IL-6 synthesis. *Cytokine* 8, 70-9.

Decker T, Kovarik P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628-37.

Dhabhar FS. (2013) Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin. *Clin Dermatol* 31, 18-30.

Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. (2009) The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 129, 1339-50.

Dinarello CA. (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20, S1-13.

Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretschmar K, Simons BD, Charalambous M, Ferron SR, Heralut Y, Pavlovic G, Ferguson-Smith AC, Watt FM. (2013) Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 504, 277-81.

Duan H, Koga T, Kohda F, Hara H, Urabe K, Furue M. (2001) Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. *J Dermatol Sci* 26, 119-24.

Eghlileb AM, Davies EE, Finlay AY. (2007) Psoriasis has a major secondary impact on the lives of family members and partners. *Br J Dermatol* 156, 1245-50.

Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, Voorhees JJ, Abecasis GR, Nair RP. (2010) Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol* 130, 1213-26.

Enamandram M, Kimball AB. (2013) Psoriasis epidemiology: the interplay of genes and the environment. *J Invest Dermatol* 133, 287-9.

Eyden B. (2004) Fibroblast phenotype plasticity: relevance for understanding heterogeneity in "fibroblastic" tumors. *Ultrastruct Pathol* 28, 307-19.

Farkas A, Kemeny L. (2013) Alcohol, liver, systemic inflammation and skin: a focus on patients with psoriasis. *Skin Pharmacol Physiol* 26, 119-26.

Faustman D, Davis M. (2010) TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 9, 482-93.

Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer H-D. (2007) The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Keratinocytes. *Current Biology* 17, 1140-5.

Ferenbach DA, Hughes J. (2011) Adenosine A(2A) agonists as therapy for glomerulonephritis. *Kidney Int* 80, 329-31.

Fredholm BB. (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14, 1315-23.

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53, 527-52.

Garcia GE, Truong LD, Chen JF, Johnson RJ, Feng L. (2011) Adenosine A(2A) receptor activation prevents progressive kidney fibrosis in a model of immune-associated chronic inflammation. *Kidney Int* 80, 378-88.

Garcia-Garcia FJ, Mullol J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, Roca-Ferrer J, Picado C. (2012) Signal transduction pathways (MAPKs, NF-kappaB, and C/EBP) regulating COX-2 expression in nasal fibroblasts from asthma patients with aspirin intolerance. *PLoS One* 7, e51281.

Gelfand JM, Weinstein R, Porter SB, Neimann AL, Berlin JA, Margolis DJ. (2005) Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch Dermatol* 141, 1537-41.

Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM. (2000) Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* 165, 7199-206.

Ghosh S, Hayden MS. (2012) Celebrating 25 years of NF-kappaB research. *Immunol Rev* 246, 5-13.

Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME. (1989) Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology* 66, 196-200.

Gottlieb AB, Dann F. (2009) Comorbidities in patients with psoriasis. *Am J Med* 122, 1150 e1-9.

Guía INFAC (2007) Gobierno Vasco 5, 25-8

Hagemann C, Blank JL. (2001) The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13, 863-75.

Harizi H, Gualde N. (2005) The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* 65, 507-14.

Hasko G, Cronstein BN. (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25, 33-9.

Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7, 759-70.

Haskó G, Cronstein BN. (2013) Regulation of inflammation by adenosine. *Frontiers in Immunology* 4, article 85.

Hayden MS, Ghosh S. (2011) NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 21, 223-44.

Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy SH, Grisotto M, Renia L, Conway SJ, Stanley ER, Chan JK, Ng LG, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. (2012) Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209, 1167-81.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72, 847-55.

Ikai K. (1999) Psoriasis and the arachidonic acid cascade. *J Dermatol Sci* 21, 135-46.

Jacobson KA, Gao ZG. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5, 247-64.

Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. (2010) Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 130, 1373-83.

Kalia S, Dutz JP. (2007) New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. *Dermatol Ther* 20, 160-74.

Kalinski P, Hilkens CM, Sniijders A, Sniijdewint FG, Kapsenberg ML. (1997) Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE<sub>2</sub>, promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol* 417, 363-7.

Kalluri R, Zeisberg M. (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401.

Kanda N, Mitsui H, Watanabe S. (2004) Prostaglandin E<sub>2</sub> suppresses CCL27 production through EP2 and EP3 receptors in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 114, 1403-9.

Kaye JA, Li L, Jick SS. (2008) Incidence of risk factors for myocardial infarction and other vascular diseases in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 159, 895-902.

Khanjani S, Terzidou V, Johnson MR, Bennett PR. (2012) NFκB and AP-1 drive human myometrial IL8 expression. *Mediators Inflamm* 2012, 504952.

Kim GK, Del Rosso JQ. (2010) Drug-provoked psoriasis: is it drug induced or drug aggravated?: understanding pathophysiology and clinical relevance. *J Clin Aesthet Dermatol* 3, 32-8.

Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhn YS, Song YS. (2009) Involvement of NF-κB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis* 30, 753-7.

Kleyn CE, Schneider L, Saraceno R, Mantovani C, Richards HL, Fortune DG, Cumberbatch M, Dearman RJ, Terenghi G, Kimber I, Griffiths CE. (2008) The effects of acute social stress on epidermal Langerhans' cell frequency and expression of cutaneous neuropeptides. *J Invest Dermatol* 128, 1273-9.

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. (2007) Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* 185, 191-203.

Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. (2010) Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov* 9, 703-18.

Kragballe K, Desjarlais L, Voorhees JJ. (1985) Leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> stimulate DNA synthesis in cultured human epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol* 113, 43-52.

Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M, Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H. (2005) Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. *J Mol Med (Berl)* 83, 964-75.

Kunisch E, Jansen A, Kojima F, Loffler I, Kapoor M, Kawai S, Rubio I, Crofford LJ, Kinne RW. (2009) Prostaglandin E2 differentially modulates proinflammatory/prodestructive effects of TNF-alpha on synovial fibroblasts via specific E prostanoïd receptors/cAMP. *J Immunol* 183, 1328-36.

Kurd SK, Troxel AB, Crits-Christoph P, Gelfand JM. (2010) The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. *Arch Dermatol* 146, 891-5.

Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Romacho T, Nevado J, Rodriguez-Manas L, Moncada S, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF. (2008) The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *J Hypertens* 26, 478-85.

Lai Y, Li D, Li C, Muehleisen B, Radek KA, Park HJ, Jiang Z, Li Z, Lei H, Quan Y, Zhang T, Wu Y, Kotol P, Morizane S, Hata TR, Iwatsuki K, Tang C, Gallo RL. (2012) The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity* 37, 74-84.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schroder JM, Liu YJ, Gilliet M. (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564-9.

Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. (2005) Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2, ii18-23; discussion ii4-5.

Latarjet M, Ruiz Liard A, Pro E. (2004) *Anatomía humana*, 4a. Médica Panamericana.

Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-62.

Levy DE, Lee CK. (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109, 1143-8.

Li YY, Zollner TM, Schon MP. (2008) Targeting leukocyte recruitment in the treatment of psoriasis. *Clin Dermatol* 26, 527-38.

Liu L, Ge D, Ma L, Mei J, Liu S, Zhang Q, Ren F, Liao H, Pu Q, Wang T, You Z. (2012) Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. *J Thorac Oncol* 7, 1091-100.

Liu S, Chen ZJ. (2011) Expanding role of ubiquitination in NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21, 6-21.

Liu YJ. (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.

Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. (2007) Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-73.

Lu Y, Chen H, Nikamo P, Qi Low H, Helms C, Seielstad M, Liu J, Bowcock AM, Stahle M, Liao W. (2013) Association of cardiovascular and metabolic disease genes with psoriasis. *J Invest Dermatol* 133, 836-9.

MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, Kristariyanto Y, van den Bosch M, Mudaliar M, McCarthy PC, Pattison MJ, Pedrioli PG, Barton GJ, Toth R, Prescott A, Arthur JS. (2013) PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol* 190, 565-77.

Marble DJ, Gordon KB, Nickoloff BJ. (2007) Targeting TNFalpha rapidly reduces density of dendritic cells and macrophages in psoriatic plaques with restoration of epidermal keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci* 48, 87-101.

Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, R DIP, Melani A, Bramanti P, Pedata F, Cuzzocrea S. (2011) CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *J Rheumatol* 38, 2119-29.

Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, Di Paola R, Melani A, Bramanti P, Pedata F, Cuzzocrea S. (2011) CGS 21680, an Agonist of the Adenosine (A2A) Receptor, Reduces Progression of Murine Type II Collagen-induced Arthritis. *J Rheumatol* 38, 2119-29.

McMillan DH, Woeller CF, Thatcher TH, Spinelli SL, Maggirwar SB, Sime PJ, Phipps RP. (2013) Attenuation of inflammatory mediator production by the NF-kappaB member RelB is mediated by microRNA-146a in lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304, L774-81.

Mease PJ. (2011) Measures of psoriatic arthritis: Tender and Swollen Joint Assessment, Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Modified Nail Psoriasis Severity Index (mNAPSI), Mander/Newcastle Enthesitis Index (MEI), Leeds Enthesitis Index (LEI), Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC), Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesis Score (MASES), Leeds Dactylitis Index (LDI), Patient Global for Psoriatic Arthritis, Dermatology Life Quality Index (DLQI), Psoriatic Arthritis Quality of Life (PsAQOL), Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue (FACIT-F), Psoriatic Arthritis Response Criteria (PsARC), Psoriatic Arthritis Joint Activity Index (PsAJAI), Disease Activity in Psoriatic Arthritis (DAPSA), and Composite Psoriatic Disease Activity Index (CPDAI). *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63 Suppl 11, S64-85.

Medzhitov R, Horng T. (2009) Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9, 692-703.

Michael S, Warstat C, Michel F, Yan L, Muller CE, Nieber K. (2010) Adenosine A(2A) agonist and A(2B) antagonist mediate an inhibition of inflammation-induced contractile disturbance of a rat gastrointestinal preparation. *Purinergic Signal* 6, 117-24.

Miyoshi K, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Kanda T, Tarutani M, Iiyama T, Asao N, DiGiovanni J, Sano S. (2011) Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol* 131, 108-17.

Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT, Chimenti S, Costanzo A. (2011) Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clin Sci (Lond)* 120, 1-11.

Montesinos MC, Desai A, Cronstein BN. (2006) Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Res Ther* 8, R53.

Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. (2000) Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 656-63.

Montesinos MC, Desai A, Chen JF, Yee H, Schwarzschild MA, Fink JS, Cronstein BN. (2002) Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am J Pathol* 160, 2009-18.

Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, Cronstein BN. (2003) Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum* 48, 240-7.

Montesinos MC, Gadangi P, Longaker M, Sung J, Levine J, Nilsen D, Reibman J, Li M, Jiang CK, Hirschhorn R, Recht PA, Ostad E, Levin RI, Cronstein BN. (1997) Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors. *J Exp Med* 186, 1615-20.

Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, Balter L, Thompson LF, Resta R, Carlin G, Huie MA, Cronstein BN. (1998) Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 101, 295-300.

Morelli JG, Hake SS, Murphy RC, Norris DA. (1992) Leukotriene B4-induced human melanocyte pigmentation and leukotriene C4-induced human melanocyte growth are inhibited by different isoquinolinesulfonamides. *J Invest Dermatol* 98, 55-8.

Morhenn VB, Nelson TE, Gruol DL. (2013) The rate of wound healing is increased in psoriasis. *J Dermatol Sci* 72, 87-92.

Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JR. (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 40, 787-92.

Muniyappa H, Das KC. (2008) Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* 20, 675-83.

Nagao S, Seishima M, Mori S, Nozawa Y. (1988) Increased protein kinase C activity in fibroblast membranes from psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 90, 406-8.

Nakao S, Inoue D. (2009) Involvement of protein kinase C in IL-1beta-induced expression of cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *J Oral Sci* 51, 417-23.

Nakao S, Ogtata Y, Shimizu E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. (2002) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 238, 11-8.

Nakayama T, Mutsuga N, Yao L, Tosato G. (2006) Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *J Leukoc Biol* 79, 95-104.

Naldi L. (2004) Epidemiology of psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3, 121-8.

Nast A, Boehncke WH, Mrowietz U, Ockenfels HM, Philipp S, Reich K, Rosenbach T, Sammain A, Schlaeger M, Sebastian M, Sterry W, Streit V, Augustin M, Erdmann R, Klaus J, Koza J, Muller S, Orzechowski HD, Rosumeck S, Schmid-Ott G y cols. (2012) S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. *J Dtsch Dermatol Ges* 10 Suppl 2, S1-95.

Naylor AJ, Filer A, Buckley CD. (2013) The role of stromal cells in the persistence of chronic inflammation. *Clin Exp Immunol* 171, 30-5

Nesher G, Mates M, Zevin S. (2003) Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 571-2.

Nestle FO, Conrad C. (2004) The IL-12 family member p40 chain as a master switch and novel therapeutic target in psoriasis. *J Invest Dermatol* 123, xiv-xv.

Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. (1994) Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 94, 202-9.

Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. (2009) Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496-509.

Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M. (2005) Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202, 135-43.

Netter FH. (2011) *Atlas de la anatomía humana*, 5\* ed. Elsevier Masson.

Nickoloff BJ, Nestle FO. (2004) Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113, 1664-75.

O'Brien M, Koo J. (2006) The mechanism of lithium and beta-blocking agents in inducing and exacerbating psoriasis. *J Drugs Dermatol* 5, 426-32.

Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. (2011) Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118, 5498-505.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW y cols. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-25.

Ozawa M, Terui T, Tagami H. (2005) Localization of IL-8 and complement components in lesional skin of psoriasis vulgaris and pustulosis palmaris et plantaris. *Dermatology* 211, 249-55.

Palfreeman AC, McNamee KE, McCann FE. (2013) New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: a focus on apremilast. *Drug Des Devel Ther* 7, 201-10.

Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM, Identification, Management of P, Associated Comorbidity project t. (2013) Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 133, 377-85.

Paulissen M, Peereboom-Stegeman JH, van de Kerkhof PC. (1990) An ultrastructural study of transcutaneous migration of polymorphonuclear leukocytes following application of leukotriene B4. *Skin Pharmacol* 3, 236-47.

Paulissen SM, van Hamburg JP, Davelaar N, Asmawidjaja PS, Hazes JM, Lubberts E. (2013) Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *J Immunol* 191, 1364-72.

Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. (2012) Psoriasis. *Annu Rev Pathol* 7, 385-422.

Perez-Aso M, Mediero A, Cronstein BN. (2013) Adenosine A2A receptor (AR) is a fine-tune regulator of the collagen1:collagen3 balance. *Purinergic Signal* 9, 573-83.

Perez-Aso M, Fernandez P, Mediero A, Chan ES, Cronstein BN. (2014) Adenosine 2A receptor promotes collagen production by human fibroblasts via pathways involving cyclic AMP and AKT but independent of Smad2/3. *FASEB J* 28, 802-12.

Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, Krasowska D, Michalak-Stoma A, Nockowski P, Osemlak P, Paszkowski T, Rolinski JM. (2008) Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta* 394, 7-21.

Prieto-Perez R, Cabaleiro T, Dauden E, Ochoa D, Roman M, Abad-Santos F. (2013) Genetics of psoriasis and pharmacogenetics of biological drugs. *Autoimmune Dis* 2013, 613086.

Qian X, Huang C, Cho CH, Hui WM, Rashid A, Chan AO. (2008) E-cadherin promoter hypermethylation induced by interleukin-1beta treatment or H. pylori infection in human gastric cancer cell lines. *Cancer Lett* 263, 107-13.

Quivy V, Van Lint C. (2004) Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol* 68, 1221-9.

Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. (2008) Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 847-61.

Raut AS, Prabhu RH, Patravale VB. (2013) Psoriasis clinical implications and treatment: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 30, 183-216.

Ravindran JS, Owen P, Lagan A, Lewis J, Korendowych E, Welsh K, McHugh N. (2004) Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 43, 22-6.

Raynaud F, Evain-Brion D. (1991) Protein kinase C activity in normal and psoriatic cells: cultures of fibroblasts and lymphocytes. *Br J Dermatol* 124, 542-6.

Razani B, Reichardt AD, Cheng G. (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev* 244, 44-54.

Reich NC. (2009) STAT3 revs up the powerhouse. *Sci Signal* 2, pe61.

Remy W, Sigl I, Leipold B. (1986) Prostaglandin E2 gel improvement of psoriatic lesions. *Int J Dermatol* 25, 266-8.

Reynolds NJ, McCombie SW, Shankar BB, Bishop WR, Fisher GJ. (1997) SCH 47112, a novel staurosporine derivative, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and epidermal hyperplasia in hairless mouse skin. *Arch Dermatol Res* 289, 540-6.

Ricciotti E, FitzGerald GA. (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 986-1000.

Riis JL, Johansen C, Vestergaard C, Otkjaer K, Kragballe K, Iversen L. (2011) CCL27 expression is regulated by both p38 MAPK and IKKbeta signalling pathways. *Cytokine* 56, 699-707.

Rincon M, Tugores A, Lopez-Rivas A, Silva A, Alonso M, De Landazuri MO, Lopez-Botet M. (1988) Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur J Immunol* 18, 1791-6.

Rose BA, Force T, Wang Y. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev* 90, 1507-46.

Rosenkilde MM, Schwartz TW. (2004) The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 112, 481-95.

Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 103-12.

Roux PP, Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-44.

Ryan C, Korman NJ, Gelfand JM, Lim HW, Elmets CA, Feldman SR, Gottlieb AB, Koo JY, Lebwohl M, Leonardi CL, Van Voorhees AS, Bhushan R, Menter A. (2014) Research gaps in psoriasis: opportunities for future studies. *J Am Acad Dermatol* 70, 146-67.

Saalbach A, Klein C, Schirmer C, Briest W, Anderegg U, Simon JC. (2010) Dermal fibroblasts promote the migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 130, 444-54.

Sagi L, Trau H. (2011) The Koebner phenomenon. *Clin Dermatol* 29, 231-6.

Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C. (2012) Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 132, 1877-85.

Sakaki H, Matsumiya T, Kusumi A, Imaizumi T, Satoh H, Yoshida H, Satoh K, Kimura H. (2004) Interleukin-1beta induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oral Dis* 10, 87-93.

Sato H, Nakayama Y, Yamashita C, Uno H. (2004) Anti-inflammatory effects of tacalcitol (1,24(R)(OH)2D3, TV-02) in the skin of TPA-treated hairless mice. *J Dermatol* 31, 200-17.

Säve S, Mohlin C, Vumma R, Persson K. (2011) Activation of adenosine A2A receptors inhibits neutrophil transuroepithelial migration. *Infect Immun* 79, 3431-7.

Scher JU, Pillinger MH. (2009) The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 57, 703-8.

Schindler C, Levy DE, Decker T. (2007) JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 282, 20059-63.

Schirmer C, Klein C, von Bergen M, Simon JC, Saalbach A. (2010) Human fibroblasts support the expansion of IL-17-producing T cells via up-regulation of IL-23 production by dendritic cells. *Blood* 116, 1715-25.

Schon MP, Boehncke WH. (2005) Psoriasis. *N Engl J Med* 352, 1899-912.

Schon MP, Boehncke WH, Brocker EB. (2005) Psoriasis: Clinical manifestations, pathogenesis and therapeutic perspectives. *Discov Med* 5, 253-8.

Schumacher M, Schuster C, Rogon ZM, Bauer T, Caushaj N, Baars S, Szabowski S, Bauer C, Schorpp-Kistner M, Hess J, Holland-Cunz S, Wagner EF, Eils R, Angel P, Hartenstein B. (2014) Efficient Keratinocyte Differentiation Strictly Depends on JNK-Induced Soluble Factors in Fibroblasts. *J Invest Dermatol* 134, 1332-41.

Shaw FL, Melody KT, Ogden S, Dearman RJ, Kimber I, Griffiths CE. (2014) Treatment-related restoration of Langerhans cell migration in psoriasis. *J Invest Dermatol* 134, 268-71.

Shaw FL, Cumberbatch M, Kleyn CE, Begum R, Dearman RJ, Kimber I, Griffiths CE. (2010) Langerhans cell mobilization distinguishes between early-onset and late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol* 130, 1940-2.

Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. (2011) A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* 21, 86-102.

Shiraishi H, Yoshida H, Saeki K, Miura Y, Watanabe S, Ishizaki T, Hashimoto M, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. (2008) Prostaglandin E2 is a major soluble factor produced by stromal cells for preventing inflammatory cytokine production from dendritic cells. *Int Immunol* 20, 1219-29.

Sigmundsdottir H, Johnston A, Gudjonsson JE, Bjarnason B, Valdimarsson H. (2004) Methotrexate markedly reduces the expression of vascular E-selectin, cutaneous lymphocyte-associated antigen and the numbers of mononuclear leucocytes in psoriatic skin. *Experimental Dermatology* 13, 426-34.

Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M. (2004) Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22, 657-82.

Sivamani RK, Correa G, Ono Y, Bowen MP, Raychaudhuri SP, Maverakis E. (2010) Biological therapy of psoriasis. *Indian J Dermatol* 55, 161-70.

Skov L, Beurskens FJ, Zachariae CO, Reitamo S, Teeling J, Satijn D, Knudsen KM, Boot EP, Hudson D, Baadsgaard O, Parren PW, van de Winkel JG. (2008) IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. *J Immunol* 181, 669-79.

Smith TJ. (2005) Insights into the role of fibroblasts in human autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 141, 388-97.

Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA, Markur D, Hartmann K, Scharffetter-Kochanek K, Peters T, van Rooijen N, Krieg T, Haase I. (2006) Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 116, 2094-104.

Sun SC. (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 21, 71-85.

Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, Watanabe N, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T. (2000) The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett* 465, 23-7.

Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. (2011) Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 303, 691-705.

Symons A, Beinke S, Ley SC. (2006) MAP kinase kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol* 27, 40-8.

Tak PP, Firestein GS. (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107, 7-11.

Takahashi H, Tsuji H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. (2009) Cell proliferation and cytokine induction by TNF-alpha of psoriatic keratinocytes are not different from normal keratinocytes in vitro. *Indian J Dermatol* 54, 237-9.

Takayama K, Garcia-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Jr., Libby P. (2002) Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 277, 44147-54.

Tkach M, Rosembliit C, Rivas MA, Proietti CJ, Diaz Flaque MC, Mercogliano MF, Beguelin W, Maronna E, Guzman P, Gercovich FG, Gil Deza E, Elizalde PV, Schillaci R. (2013) p42/p44 MAPK-mediated Stat3 Ser727 phosphorylation is required for progestin-induced full activation of Stat3 and breast cancer growth. *Endocr Relat Cancer* 20, 197-212.

Tortora GJ, Derrickson B. (2006) *Principios de anatomía y fisiología*, 11a ed. Médica Panamericana.

Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1654-61.

Tu CL, Bikle DD. (2013) Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27, 415-27.

Uddin S, Lekmine F, Sharma N, Majchrzak B, Mayer I, Young PR, Bokoch GM, Fish EN, Platanias LC. (2000) The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem* 275, 27634-40.

Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. (2009) Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol* 30, 494-501.

Valls MD, Cronstein BN, Montesinos MC. (2009) Adenosine receptor agonists for promotion of dermal wound healing. *Biochem Pharmacol* 77, 1117-24.

Vesey DA, Cheung C, Cuttle L, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. (2002) Interleukin-1beta stimulates human renal fibroblast proliferation and matrix protein production by means of a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. *J Lab Clin Med* 140, 342-50.

Victor-Vega C, Desai A, Montesinos MC, Cronstein BN. (2002) Adenosine A2A receptor agonists promote more rapid wound healing than recombinant human platelet-derived growth factor (Becaplermin gel). *Inflammation* 26, 19-24.

Vincenzi F, Padovan M, Targa M, Corciulo C, Giacuzzo S, Merighi S, Gessi S, Govoni M, Borea PA, Varani K. (2013) A(2A) adenosine receptors are differentially modulated by pharmacological treatments in rheumatoid arthritis patients and their stimulation ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *PLoS One* 8, e54195.

Wagner EF, Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E. (2010) Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 6, 704-14.

Wang H, Peters T, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. (2009) Key role of macrophages in the pathogenesis of CD18 hypomorphic murine model of psoriasis. *J Invest Dermatol* 129, 1100-14.

Wang H, Peters T, Kess D, Sindrilaru A, Oreshkova T, Van Rooijen N, Stratis A, Renkl AC, Sunderkotter C, Wlaschek M, Haase I, Scharffetter-Kochanek K. (2006) Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest* 116, 2105-14.

Wang XS, Lau HY. (2006) Prostaglandin E potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy* 61, 503-6.

Wang Y, van Boxel-Dezaire AH, Cheon H, Yang J, Stark GR. (2013) STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16975-80.

Warren R, Chalmers R, Griffiths C, Menter A. (2008) Methotrexate for psoriasis in the era of biological therapy. *Clin Exp Dermatol* 33, 551-4.

Weiss SC, Kimball AB, Liewehr DJ, Blauvelt A, Turner ML, Emanuel EJ. (2002) Quantifying the harmful effect of psoriasis on health-related quality of life. *J Am Acad Dermatol* 47, 512-8.

Weller CL, Collington SJ, Hartnell A, Conroy DM, Kaise T, Barker JE, Wilson MS, Taylor GW, Jose PJ, Williams TJ. (2007) Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11712-7.

Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185, 6413-9.

Wessels JA, Kooloos WM, De Jonge R, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, Collee G, De Sonnaville P, Lindemans J, Huizinga TW, Guchelaar HJ. (2006) Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 2830-9.

Weston CR, Davis RJ. (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19, 142-9.

Williams SC. (2012) New biologic drugs get under the skin of psoriasis. *Nat Med* 18, 638.

Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, Farrar WL. (2004) NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer Biol Ther* 3, 1007-17.

Xing F, Saidou J, Watabe K. (2010) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15, 166-79.

Yang G, Im HJ, Wang JH. (2005) Repetitive mechanical stretching modulates IL-1beta induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. *Gene* 363, 166-72.

Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. (2012) Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells* 30, 2283-96.

Yu H, Pardoll D, Jove R. (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9, 798-809.

Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, Krueger JG, Lowes MA. (2009) Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 129, 79-88.

Zago M, Rico de Souza A, Hecht E, Rousseau S, Hamid Q, Eidelman DH, Bagloli CJ. (2014) The NF-kappaB family member RelB regulates microRNA miR-146a to suppress cigarette smoke-induced COX-2 protein expression in lung fibroblasts. *Toxicol Lett* 226, 107-16.

Zaja-Milatovic S, Richmond A. (2008) CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histol Histopathol* 23, 1399-407.

Zalewska A, Glowacka E, Wyczolkowska J, Tchorzewski H, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A. (2006) Interleukin 6 and 8 levels in plasma and fibroblast cultures in psoriasis. *Mediators Inflamm* 2006, 81767.

Zhang QY, Hammerberg C, Baldassare JJ, Henderson PA, Burns D, Ceska M, Voorhees JJ, Fisher GJ. (1992) Retinoic acid and phorbol ester synergistically up-regulate IL-8 expression and specifically modulate protein kinase C-epsilon in human skin fibroblasts. *J Immunol* 149, 1402-8.

Zhang Y, Liu G, Dong Z. (2001) MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J Biol Chem* 276, 42534-42.

Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 9, 625-36.



# ANEXOS

---



**Procedencia de las biopsias psoriásicas empleadas en la presente Tesis Doctoral.**

<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Localización</b>
M	47	pierna
M	46	codo
M	60	codo
M	43	codo
M	43	dedo, cara palmar
M	4	periumbilical
M	64	codo
M	65	tórax
M	46	tórax
M	58	lumbar
F	20	codo
M	27	muslo
F	51	pierna
M	36	cuero cabelludo
M	83	rodilla
F	34	nalga
M	39	brazo
F	24	muslo
F	47	muslo
M	32	muslo
F	29	antebrazo
M	12	cc postauricular
F	69	codo
F	41	codo
M	74	rodilla
M	25	antebrazo
M	44	codo
F	25	brazo
M	65	bxcodo
M	22	brazo
F	40	bx cadera
M	24	palma mano
M	40	bx pretibial
M	65	palma mano
M	67	bx pierna
M	42	rodilla

M	43	antebrazo
M	65	pierna
F	56	abdomen
M	33	abdomen
M	29	abdomen
M	67	tórax
F	48	pierna
M	64	inframamario
M	48	antebrazo
M	60	muslo
F	39	muslo
M	22	abdomen
M	49	brazo
M	27	retroauricular
M	45	brazo
F	55	brazo
M	40	nalga
M	59	muslo

## Informe del Comité Ético de Investigación Animal



**D. Enrique Font Bisier**, Profesor Titular de Zoología y Secretario del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universitat de València el día 13 de febrero de 2012, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal A1328805743080 titulado "Estímulo farmacológico de la protección tisular en enfermedades inflamatorias de la piel: modelo de Hiperplasia epidérmica inducida por TPA en ratón", cuya investigadora principal es Dña. M<sup>o</sup> Carmen Montesinos Mezquita.

En València, a 5 de marzo de 2012.



## Informe del Comité Ético de Investigación en Humanos

VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA  
Vicerectorat d'Investigació i Política Científica

**D. Fernando A. Verdú Pascual**, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

**CERTIFICA:**

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada en el día de hoy, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

*"Mecanismos implicados en la protección y regeneración tisular en afecciones cutáneas con componente inflamatorio"*,  
cuya investigadora principal es Dña. M<sup>a</sup> Carmen Montesinos Mezquina,

ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a dieciocho de febrero de dos mil nueve.

**Fernando Verdú Pascual**  
Profesor Titular de Medicina Legal y Forense

VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA (Q\*)  
Facultat de Medicina i Odontologia  
Valencia España

**Certifico la precisión e  
integridad de este  
documento**  
2009.02.18 17:06:22  
+01'00'

Carrer de l'Alfama 13  
VALÈNCIA 46103

Telèfon: 963 306 41 100  
Fax: 963 306 32 23  
e-mail: [secretari@etica.uv.es](mailto:secretari@etica.uv.es)



