



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS MEDICAMENTOS
BIOLÓGICOS SOBRE LA INFLAMACIÓN VASCULAR EN
PACIENTES CON PSORIASIS**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA GARCÍA MARTÍNEZ

Directores

Isabel Andújar Pérez

Juan Vicente Esplugues Mota

Ángeles Álvarez Ribelles

Valencia, 2022

Dña. Isabel Andújar Pérez, Profesora Asociada del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

D. Juan Vicente Esplugues Mota, Catedrático del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dña. Ángeles Álvarez Ribelles, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA/N:

Que el trabajo titulado **“Caracterización del efecto de los medicamentos biológicos sobre la inflamación vascular en pacientes con psoriasis”**, presentado por la Graduada en Farmacia **Patricia García Martínez**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral.

Para que así conste, se expide la presente certificación en Valencia, a 13 de mayo de 2022.



Fdo. Dra. I. Andújar Pérez



Dr. J.V. Esplugues Mota



Dra. Á. Álvarez Ribelles

“Lo que tenga que ser,será”

Lorenzo García Alfaro, mi padre

A los que hacéis que merezca la pena



Índice

Siglas y abreviaturas	1
Lista de figuras	9
Lista de tablas	15
I. Introducción.....	19
1. PSORIASIS MODERADA-SEVERA	21
1.1. Generalidades de la psoriasis	21
1.2. Etiología.....	24
1.3. Inmunopatogénesis.....	26
1.4. Repercusión sistémica de la psoriasis moderada-severa.	
Comorbilidades	32
2. RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON PSORIASIS	
 MODERADA-SEVERA.....	34
2.1. Asociación epidemiológica entre psoriasis y enfermedades	
cardiovasculares.....	34
2.2. Manifestaciones cardiovasculares en pacientes con psoriasis	
moderada-severa	36
2.2.1. <i>Desarrollo de aterosclerosis en pacientes con psoriasis</i>	
<i>moderada-severa</i>	<i>40</i>
3. PROCESO INFLAMATORIO Y TROMBÓTICO	44
3.1. Interacción leucocito-endotelio	44
3.2. Proceso trombótico.....	48
4. IMPLICACIÓN DEL TRATAMIENTO SISTÉMICO DE LA PSORIASIS	
 MODERADA-SEVERA SOBRE LA COMORBILIDAD CARDIOVASCULAR	
 	50
4.1. Tratamiento de la psoriasis	50
4.1.1. <i>Terapias sistémicas con pequeñas moléculas</i>	<i>52</i>
4.1.2. <i>Terapias sistémicas biológica con anticuerpos</i>	
<i>monoclonales</i>	<i>55</i>

ÍNDICE

4.1.2.1. Señalización TNF α : biológicos anti-TNF α	56
4.1.2.2. Señalización eje IL-23/Th17: biológicos anti- IL17 y IL-23 y/o IL-12.....	58
4.1.2.3. Biosimilares.....	61
4.1.3. Esquema terapéutico actual de la terapia sistémica en psoriasis moderada-severa	61
4.2. Repercusión del tratamiento sistémico sobre la comorbilidad cardiovascular.....	65
II. Objetivos.....	67
III. Material y métodos.....	71
1. MATERIAL	73
1.1. Fármacos empleados.....	73
1.2. Reactivos	74
2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> EMPLEANDO UN MODELO MURINO.....	76
2.1. Animales de experimentación.....	76
2.2. Modelo murino de psoriasis inducida por imiquimod.....	76
2.3. Microscopía intravital.....	78
2.3.1. Evaluación intravital de interacciones leucocito-endotelio.....	79
2.3.2. Evaluación intravital de trombosis arterial: modelo de trombosis inducida por superfusión de cloruro férrico (FeCl ₃).....	80
2.4. Protocolo experimental in vivo: tratamiento farmacológico de ratones con psoriasis y evaluación de la interacción leucocito-endotelio y la formación de trombosis.....	82
2.5. Recolección de tejidos.....	85
2.6. Tinción hematoxilina-eosina de la piel afecta	85
2.6.1. Análisis del espesor dérmico.....	86

2.7. Medida de la masa esplénica	86
2.8. Medida dímero D en suero de ratón	86
3. ESTUDIOS PRECLÍNICOS CON MUESTRAS HUMANAS DE PACIENTES CON PSORIASIS.....	87
3.1. Selección de la población de estudio	87
3.2. Recolección de las muestras de sangre periférica.....	89
3.3. Estudio de interacción leucocito-endotelio en cámara paralela de flujo.....	89
3.3.1. <i>Aislamiento y cultivo de células endoteliales</i>	90
3.3.2. <i>Aislamiento de leucocitos</i>	91
3.3.3. <i>Adhesión dinámica en cámara paralela de flujo</i>	93
3.1.1.1. <i>Parámetros leucocitarios determinados</i>	96
3.4. Estudio de la expresión de las moléculas de adhesión por citometría de flujo.....	97
3.5. Estudio de los complejos plaqueta-leucocito por citometría de flujo.....	98
3.5.1. <i>Porcentaje de complejos plaqueta-leucocito</i>	98
3.5.2. <i>Caracterización de complejos plaqueta-leucocito</i>	100
3.6. Medida del dímero D en plasma humano	102
4. COMITÉS ÉTICOS.....	102
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	102
IV. Resultados	105
1. RESULTADOS OBTENIDOS EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE PSORIASIS INDUCIDA POR APLICACIÓN DE IMIQUIMOD.....	107
1.1. Puesta a punto del modelo murino de psoriasis inducida por imiquimod	107
1.2. Manifestaciones cardiovasculares tras la inducción e instauración de la psoriasis	110
1.2.1. <i>Interacción leucocito-endotelio en vénulas cremastéricas</i>	

<i>de ratón con psoriasis inducida</i>	110
1.2.2. <i>Trombosis inducida en arteriola cremastérica de ratón con psoriasis inducida</i>	112
1.3. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las manifestaciones cutáneas y cardiovasculares de la psoriasis inducida en un modelo murino.....	114
1.3.1. <i>Efecto sobre el daño cutáneo y el aumento de masa esplénica</i>	114
1.3.2. <i>Efectos de la terapia sobre la interacción leucocito-endotelio en vénulas cremastéricas de ratón con psoriasis inducida</i>	118
1.3.3. <i>Efectos de la terapia sobre la tendencia a la formación de trombos en arteriola cremastérica de ratón con psoriasis inducida</i>	120
2. RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES CON PSORIASIS	122
2.1. Caracterización del estado proinflamatorio vascular de pacientes con psoriasis en placa moderada-severa no controlada	122
2.1.1. <i>Expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y monocitos de pacientes naïve</i>	122
2.1.2. <i>Interacción leucocito-endotelio de PMNs y PBMCs de pacientes naïve</i>	124
2.2. Impacto de las diferentes terapias sistémicas sobre el estado proinflamatorio vascular asociado a la psoriasis moderada-severa	126
2.2.1. <i>Efectos de la terapia sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes con psoriasis en remisión clínica</i>	126
2.2.2. <i>Efectos de la terapia sobre la interacción leucocito-endotelio de PMNs y PBMCs de pacientes con psoriasis en</i>	

<i>remisión clínica</i>	130
2.2.3. <i>Diferencias en la interacción leucocito-endotelio antes y después del tratamiento con un fármaco biológico</i>	133
2.3. <i>Implicación de los complejos leucocito-plaqueta en el desarrollo clínico y cardiovascular de la psoriasis</i>	136
2.3.1. <i>Cantidad y caracterización de complejos plaqueta-leucocito en pacientes con psoriasis frente a la población sana</i>	136
2.3.2. <i>Relación entre los PLC y evolución de la clínica cutánea en pacientes de psoriasis naïve</i>	140
2.3.3. <i>Relación entre los PLC y la inflamación vascular en pacientes de psoriasis naïve</i>	141
V. Discusión	143
VI. Conclusiones	163
VII. Bibliografía	167
VIII. Anexo	193
1. CONCENTRACIONES DíMERO D	195
1.1. <i>Concentración dímero D en suero de ratón</i>	195
1 2. <i>Concentración dímero D en plasma de pacientes psoriásicos</i>	196
2. TABLAS DE PRETRATAMIENTO FRENTE A POST-TRATAMIENTO	196
IX. Certificados	201



Siglas y abreviaturas

AcM	anticuerpo monoclonal.
ADA	adalimumab.
ADP	nucleótido adenosín difosfato (<i>adenosine-diphosphate</i>).
AEDV	Academia Española de Dermatología y Venereología.
AMP	nucleótido adenosín monofosfato (<i>adenosine-monophosphate</i>).
AINE	antiinflamatorio no esteroideo.
ATP	nucleótido adenosin trifosfato (<i>adenosine-triphosphate</i>).
BSA	superficie de cuerpo afectada (<i>Body Surface Area</i>).
CARIMA	Evaluación de marcadores de riesgo cardiovascular en pacientes con psoriasis tratados con secukinumab (Evaluation of Cardiovascular Risk Markers in Psoriasis Patients Treated with Secukinumab), ensayo clínico.
CD	célula dendrítica.
CD39	ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa.
CD73	ecto-5'-nucleotidasa.
CPA	célula presentadora de antígenos.
CR4	complemento del receptor 4 (<i>Complement receptor 4</i>), integrina $\beta 2$.
DD	dímero D.
DE	desviación estándar.
Desc	dato desconocido.
DLQI	índice de calidad de vida dermatológico (<i>Dermatology Life Quality Index</i>).
DMF	dimetilfumarato.
DPBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>).

SIGLAS Y ABREVIATURAS

EAF	ésteres de ácido fumárico.
EBM-2	medio basal de células endoteliales (<i>Endothelial cell basal Medium-2</i>).
ECV	enfermedad cardiovascular.
EEM	error estándar de la media.
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial.
ESAF	factor endotelial activador de la angiogénesis (<i>Endothelial-cell-Stimulating Angiogenesis Factor</i>).
ET-1	endotelina 1.
ETA	etanercept.
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>).
FSC	tamaño celular (<i>Forward Scatter</i>).
GPIIb-IIIa	complejo glicoproteico IIb-IIIa plaquetario.
GPIbα	complejo glicoproteico Ib alfa plaquetario.
HBSS	solución salina equilibrada de Hanks (<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>).
HDL	lipoproteína de alta densidad (<i>High Density Lipoproteine</i>).
hFGF-B	factor básico de crecimiento de fibroblastos humano.
HLA	antígenos leucocitarios humanos (<i>Human Leukocyte Antigen</i>).
HSA	albúmina sérica humana (<i>Human Serum Albumin</i>).
HUVEC	célula endotelial de vena de cordón umbilical (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>).
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1 (<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>).

IFN	interferón.
IgG1	inmunoglobulina G1.
IL	interleucina.
IL-17RA	receptor de IL-17A.
IMC	índice de masa corporal.
IMP	nucleótido inosina monofosfato.
IMQ	imiquimod.
INF	infliximab.
Ins	insulina.
ip	intraperitoneal.
iv	intravenoso.
IRS	sustrato del receptor de insulina.
LDL	lipoproteína de baja densidad (<i>Low Density Lipoproteine</i>).
LDLox	lipoproteína de baja densidad oxidada.
LFA-1	antagonista del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos (<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>), integrina $\beta 2$.
Mac-1	molécula de adhesión celular 1, integrina $\beta 2$.
MACE	evento adverso cardiovascular mayor (<i>Major Adverse Cardiovascular Events</i>).
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>).
MEF	monoetilfumarato.
MIF	media de la intensidad de fluorescencia.
MTX	metotrexato.
NF-κB	factor nuclear kappa B.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

NK	<i>Natural Killer.</i>
NO	óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa.
ns	no significativo.
PAM	péptido antimicrobiano.
PASI	área e índice de gravedad de la psoriasis (<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>).
PBMC	célula mononuclear de sangre periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>).
PBS	tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>).
PCR	proteína C reactiva.
PDE4	inhibidor de la fosfodiesterasa 4.
PE	ficoeritrina.
PKB/AKT	proteína quinasa B.
PLC	complejo plaqueta-leucocito (<i>Platelet-Leukocyte Complex</i>).
PMC	complejo plaqueta-monocito (<i>Platelet-Monocyte Complex</i>).
PMN	polimorfonuclear.
PN	pacientes naïve.
PNC	complejo plaqueta-neutrófilo (<i>Platelet-Neutrophil Complex</i>).
PSGL-1	ligando leucocitario glicoproteico-1 de la P-selectina.
PSORS1	gen de susceptibilidad a la psoriasis 1 (<i>Psoriasis Susceptibility Gene 1</i>).
QR	código de respuesta rápida (del inglés <i>Quick Response</i>).

R3-IGF-1	factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 con arginina larga 3 recombinante.
Ras	proteína monomérica de la familia de las proteínas G.
rhEGF	factor de crecimiento epidérmico humano recombinante.
ROS	especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen species).
RPMI	medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
SEC	secukinumab.
SFB	suero fetal bovino.
SSC	granulosidad celular (<i>Side Scatter</i>).
Th	linfocito T efector (<i>T helper</i>).
TGFα	factor de crecimiento transformante alfa (<i>Transforming Growth Factor α</i>).
TLR	receptor de tipo Toll (<i>Toll Like Receptor</i>).
TNFα	factor de necrosis tumoral α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>).
TNFR	receptor de TNF.
Treg	linfocito T regulador.
UST	ustekinumab.
VCAM-1	molécula de adhesión celular vascular (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>).
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>).
VLA	antígenos de activación tardía (<i>Very Late Antigen</i>), integrina $\beta 1$.
VS	voluntarios sanos.
WT	<i>Wild Type</i> .



Lista de figuras

Figura 1.	Prevalencia mundial de psoriasis.	21
Figura 2.	Lesiones eritemato-descamativas, psoriasis en placa y psoriasis en gota.	23
Figura 3.	Fisiopatología de la psoriasis.	28
Figura 4.	Afectación de la dermis y epidermis en una lesión psoriásica.	32
Figura 5.	Mecanismos inmunológicos comunes entre la psoriasis y la aterosclerosis.	37
Figura 6.	Desarrollo de disfunción endotelial a causa de la resistencia a la insulina.	42
Figura 7.	Mecanismos implicados en el desarrollo de aterosclerosis en pacientes con psoriasis moderada-grave. Marcha psoriásica.	43
Figura 8.	Etapas del proceso de interacción leucocito-endotelio.	48
Figura 9.	Esquema terapéutico para la psoriasis en placa moderada-severa según las indicaciones aprobadas por la Agencia Médica Europea.	62
Figura 10.	Modelo murino de psoriasis inducida por imiquimod.	77
Figura 11.	Cremáster expuesto sobre pedestal transparente.	78
Figura 12.	Montaje de microscopía intravital.	79
Figura 13.	Protocolo experimental para la evaluación de la interacción leucocito-endotelio y riesgo de trombosis en ratones con psoriasis tratados con distintos fármacos biológicos.	82
Figura 14.	Protocolo experimental de tratamiento con metotrexato.	84
Figura 15.	Procesos llevados a cabo 24 horas después de la administración de los fármacos.	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 16.	Cordón umbilical humano saturado con solución de colagenasa para la extracción de células endoteliales.	91
Figura 17.	Aislamiento de leucocitos con dextrano-ficoll.	92
Figura 18.	Cámara paralela de flujo.	94
Figura 19.	Montaje de la cámara paralela de flujo.	94
Figura 20.	Montaje del sistema de cámara paralela de flujo sobre el microscopio invertido.	95
Figura 21.	Imágenes representativas de la interacción leucocito-endotelio.	96
Figura 22.	Citómetro de flujo FACS Calibur.	97
Figura 23.	Identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias en el citómetro de flujo.	97
Figura 24.	Histograma de fluorescencia de complejos plaqueta-leucocito presentes en sangre entera.	99
Figura 25.	Diagramas de la caracterización de los complejos plaqueta-leucocito por citometría de flujo.	101
Figura 26.	Manifestaciones cutáneas de la psoriasis inducida por imiquimod.	108
Figura 27.	Cambio en la masa esplénica inducido por el tratamiento con imiquimod.	109
Figura 28.	Efecto de la psoriasis inducida con imiquimod sobre la interacción leucocito-endotelio.	111
Figura 29.	Imágenes obtenidas en la microscopía intravital de vénulas cremastéricas.	111
Figura 30.	Efecto de la psoriasis inducida por imiquimod sobre la formación de trombos <i>in vivo</i>.	112
Figura 31.	Fotograma representativo de trombo producido en un ratón tratado 6 días con imiquimod tópico.	113

Figura 32.	Acantosis 24 horas después del tratamiento con un biológico.	114
Figura 33.	Imágenes representativas de la piel dorsal de los ratones teñida con tinción hematoxilina-eosina.	115
Figura 34.	Masa esplénica 24 horas después del tratamiento con un biológico.	116
Figura 35.	Efecto de metotrexato sobre la acantosis y sobre el incremento de la masa esplénica.	117
Figura 36.	Efecto de los fármacos biológicos sobre la interacción leucocito-endotelio de ratones con psoriasis inducida con imiquimod.	118
Figura 37.	Efecto de metotrexato sobre la interacción leucocito-endotelio de ratones con psoriasis inducida con imiquimod.	119
Figura 38.	Efecto de los biológicos sobre la tendencia a la formación de trombo en ratones con psoriasis inducida con imiquimod.	120
Figura 39.	Efecto de metotrexato sobre la tendencia a la formación de trombo en ratones con psoriasis inducida con imiquimod.	121
Figura 40.	Expresión de moléculas de adhesión en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (<i>naïve</i>).	123
Figura 41.	Interacción leucocito-endotelio en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (<i>naïve</i>).	125
Figura 42.	Efecto de los fármacos biológicos sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes con psoriasis moderada-grave.	127

Figura 43.	Efecto de metotrexato sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes con psoriasis moderada-grave.	129
Figura 44.	Nivel de interacción leucocito-endotelio en pacientes psoriásicos en tratamiento crónico con adalimumab, secukinumab o ustekinumab.	131
Figura 45.	Nivel de interacción leucocito-endotelio en pacientes psoriásicos en tratamiento crónico con metotrexato.	132
Figura 46.	Comparación de los parámetros de interacción PMNs-endotelio antes y después del tratamiento con un fármaco biológico.	134
Figura 47.	Comparación de los parámetros de interacción PBMCs-endotelio antes y después del tratamiento con un fármaco biológico.	135
Figura 48.	Complejos plaqueta-leucocito en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (<i>naïve</i>).	137
Figura 49.	Caracterización de los complejos plaqueta-neutrófilo en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (<i>naïve</i>).	139
Figura 50.	Relación entre los marcadores de gravedad de la psoriasis, DLQI y PASI, y el porcentaje de complejos plaqueta-neutrófilo y plaqueta-monocito.	140
Figura 51.	Relación entre la cantidad de neutrófilos en fase de rodamiento y el porcentaje de complejos plaqueta-neutrófilo en pacientes <i>naïve</i>.	141



Lista de tablas

Tabla 1.	Moléculas de adhesión principalmente implicadas en la interacción leucocito-endotelio.	45
Tabla 2.	Fármacos biológicos inhibidores de TNFα.	56
Tabla 3.	Fármacos biológicos inhibidores de IL-17.	58
Tabla 4.	Fármacos biológicos inhibidores de IL-12/23 o IL-23.	60
Tabla 5.	Reactivos utilizados.	74
Tabla 6.	Anticuerpos frente a humano utilizados.	76
Tabla 7.	Dosis de los fármacos biológicos y vías de administración empleadas en el tratamiento de los ratones con psoriasis inducida.	83
Tabla 8.	Características de los pacientes incluidos.	88
Tabla 9.	Concentración dímero D en suero de ratón.	195
Tabla 10.	Concentración dímero D en plasma de pacientes psoriásicos.	196
Tabla 11.	Diferencias en la cantidad de PMNs en fase de rodamiento antes y después del tratamiento con un fármaco biológico.	196
Tabla 12.	Diferencias en la velocidad de rodamiento de los PMNs antes y después del tratamiento con un fármaco biológico.	197
Tabla 13.	Diferencias en la cantidad de PMNs adheridos a la capa endotelial antes y después del tratamiento con un fármaco biológico.	197

LISTA DE TABLAS

- Tabla 14.** Diferencias en la cantidad de PBMCs en fase de rodamiento antes y después del tratamiento con un fármaco biológico. 198
- Tabla 15.** Diferencias en la velocidad de rodamiento de los PBMCs antes y después del tratamiento con un fármaco biológico. 198
- Tabla 16.** Diferencias en la cantidad de PBMCs adheridos a la capa endotelial antes y después del tratamiento con un fármaco biológico. 199



Introducción

1. PSORIASIS MODERADA-SEVERA.

1.1. Generalidades de la psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica cuya manifestación característica es la hiperplasia de la epidermis en forma de lesiones eritematosas (enrojecidas) y descamativas en la piel, como consecuencia última de la hiperproliferación de queratinocitos epidérmicos^{1,2}. Actualmente, se define como una enfermedad de causa desconocida con base poligénica e inmunomediada, donde influyen factores ambientales y psicosomáticos^{1,2}.

En cuanto a su prevalencia, que es muy variable según la zona geográfica, se estima que afecta a entre el 1 y el 3% de la población mundial¹⁻⁵ (**Figura 1**), y es una de las pocas enfermedades no transmisibles que la Organización Mundial de la Salud ha identificado como un importante problema de salud⁶. En España, su prevalencia se estima en un 1,4 - 2,7%⁷.

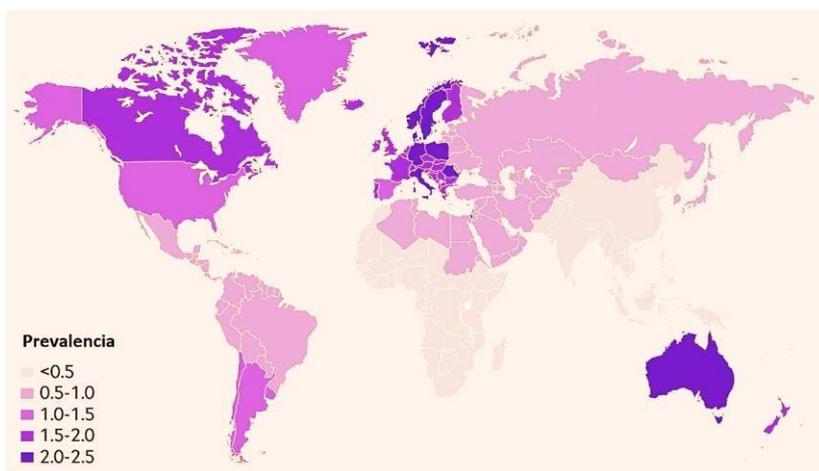


Figura 1. Prevalencia mundial de psoriasis (imagen de Parisi, 2020⁵).

Al igual que la mayoría de patologías inflamatorias autoinmunes o inmunomediadas, la psoriasis fluctúa entre periodos de remisión y

exacerbación^{1,2,8,9}. La expresión elemental de esta afección es la presencia de lesiones eritemato-escamosas (**Figura 2A**), pero puede presentar gran heterogeneidad clínica^{8,9}. En base a las características de las manifestaciones clínicas cutáneas, se clasifica en dos tipos principales^{2,8,9}:

- **Tipo estable crónico: psoriasis en placa o vulgaris (Figura 2B).** Engloba el 80 - 90% de los casos. Caracterizada por la aparición de placas bien delimitadas en la piel, de color rojo mate con escamas laxamente adheridas, laminares, de color blanco o plateado, que pueden confluir y formar lesiones más amplias y ser asintomáticas o producir prurito, ardor, dolor y/o sangrado. La mayoría de los pacientes con lesiones inactivas crónicas tiene una evolución de meses y años que se modifica con lentitud.
- **Tipo eruptivo inflamatorio: psoriasis en gota o guttate (Figura 2C).** Representa aproximadamente un 2 - 10% de los casos, se suele dar más en población infantil. Caracterizada por la aparición de múltiples lesiones pequeñas dispersas, por lo general en el tronco, y con una mayor tendencia a la resolución espontánea, aunque pueden volverse recidivantes y evolucionar hacia la psoriasis estable crónica.

Otras formas minoritarias, que suelen aparecer en combinación con la forma crónica, son^{2,9}:

- **Tipo flexural o intertriginosa: psoriasis invertida.** Cursa con manchas rojas lisas con tendencia a afectar casi de forma exclusiva a los pliegues de la piel (axilas, ingles, bajo las mamas, etcétera).
- **Psoriasis pustulosa.** Forma de presentación poco frecuente en la que aparecen ampollas en las lesiones, de forma generalizada o localizada.

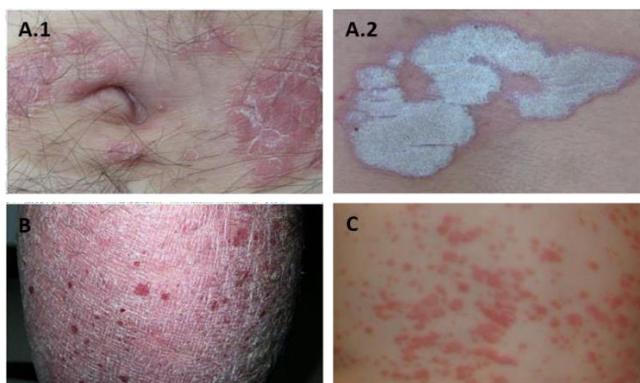


Figura 2. Lesiones eritemato-descamativas (A), psoriasis en placa (B) y psoriasis en gota (C) (fotografías de la Guía para pacientes con psoriasis de la Academia Española de Dermatología y Venereología, 2020⁸).

La presentación clínica de cada tipo puede variar entre un individuo y otro, yendo desde aquellos que solo tienen algunas placas circunscritas hasta los que presentan afectación generalizada de la piel, conocido como **eritrodermia**, la forma más grave de psoriasis, que afecta a un 2 - 3% de los pacientes^{2,9}. Además, cuando la psoriasis aparece en algunas **localizaciones concretas** de la piel puede presentar características especiales que llegan a considerarse subtipos de la enfermedad: en cuero cabelludo (presente en un 50 - 80% de los pacientes), uñas (psoriasis ungueal), genital, palmo-plantar en manos y/o pies y facial.

La evaluación e interpretación conjunta del área e índice de gravedad de la psoriasis (**PASI**, del inglés *Psoriasis Area and Severity Index*), del índice de calidad de vida dermatológico (**DLQI**, del inglés *Dermatology Life Quality Index*) y de la superficie de cuerpo afectada (**BSA**, del inglés *Body Surface Area*) es uno de los principales métodos médicos para la valoración de la gravedad de la enfermedad y su clasificación como psoriasis leve, moderada o severa. Se considera psoriasis grave aquella con valores de PASI, BSA y/o puntuación DLQI mayor de 10, o si, aun por debajo de estas puntuaciones, hay gran compromiso de áreas visibles del cuerpo, cuero cabelludo, genitales,

presencia de onicólisis de al menos dos uñas, presencia de prurito elevada o placas recalcitrantes¹⁰. Aproximadamente un 20% de los casos son considerados como psoriasis moderada-severa¹¹. Aunque la mortalidad que se le atribuye no es elevada -un aumento del riesgo relativo de mortalidad de entre 1,12 y 1,52 en comparación con la población general¹²-, esta patología conlleva una morbilidad significativa y una gran afectación de la calidad de vida¹.

1.2. Etiología.

La psoriasis es una enfermedad multifactorial sin causa directa. Los factores ambientales, la predisposición genética y los desajustes en el sistema inmunitario que los dos anteriores pueden desencadenar son los tres pilares claves para el desarrollo de la enfermedad^{1,2}.

De entre los **factores ambientales** y/o factores que comprometen el equilibrio del sistema inmune y que pueden actuar como desencadenantes de la patología, los más habituales son los traumatismos físicos (frotación y rascadura), infecciones estreptocócicas agudas (que suelen desencadenar psoriasis en gotas), el estrés (que es uno de los principales interruptores que desencadenan los periodos de exacerbación o brotes de la psoriasis, llegando a provocar el 40% de los brotes en adultos), la toma de algunos fármacos como glucocorticoides sistémicos, litio oral, antipalúdicos, interferón y bloqueadores β , o la ingesta de alcohol^{1,2,9}.

No es una patología hereditaria, pero sí que presenta **predisposición genética**. Es de base poligénica, ya que la red de estudios genómicos ha hallado polimorfismos con susceptibilidad a psoriasis en más de 80 regiones del genoma, que explican alrededor del 30% de la heredabilidad de la enfermedad¹. Muchos de los trastornos autoinmunitarios están relacionados con polimorfismos en la región del

genoma que codifica para el complejo mayor de histocompatibilidad, concretamente en el conjunto de genes encargados de codificar las proteínas de los antígenos leucocitarios humanos (HLA del inglés *human leukocyte antigen*), imprescindibles como señalización en los procesos de inmunidad adaptativa e innata¹³. La región genómica principalmente relacionada con el desarrollo de psoriasis se conoce como gen de susceptibilidad a la psoriasis 1 (PSORS1, del inglés *Psoriasis Susceptibility Gene 1*)¹⁴, que codifica principalmente genes implicados en la presentación de antígenos, siendo el alelo *HLA C*06:02* el principal factor de riesgo genético para la psoriasis de aparición temprana, pero no para la enfermedad de aparición tardía, la artritis psoriásica y las formas pustulosas de psoriasis^{1,14}. La localización de dicho alelo, junto a la de otras variantes con un efecto genético menor, señalan claramente el papel central de alteraciones de la inmunidad innata y adaptativa en la patogénesis de la enfermedad^{1,14,15}, consistente con su carácter autoinmune. Las vías cruciales afectadas incluyen aquellas que involucran interferón (IFN) tipo 1 y señalización antiviral, factor nuclear kappa B (NF-κB), interleucinas (ILs) 23 y 17, y procesamiento y presentación de antígenos. Otras regiones de susceptibilidad están implicadas en otros procesos como vías de inflamación (ej. regiones que codifican para citocinas o sus receptores), en procesos biológicos de los queratinocitos^{13,14} o en la función de barrera de la piel^{14,15}.

1.3. Inmunopatogénesis.

Las principales manifestaciones de la psoriasis son evidentes en la capa más externa de la piel; sin embargo, el desarrollo de la placa psoriática abarca capas más allá de la epidérmica y requiere la interacción de células inmunitarias innatas, adaptativas y vasculares, además de involucrar a los queratinocitos. La epidermis y la dermis reaccionan como un sistema integrado en el que los cambios en la capa germinativa de la epidermis y los cambios inflamatorios en la dermis, desencadenan cambios a nivel epidérmico^{2,16,17}.

Los estudios inmunológicos y genéticos muestran que los mecanismos principales en el desarrollo de la psoriasis son: la **activación del sistema inmunitario** innato impulsada por **señales** de peligro **endógenas**, la **comunicación alterada** entre los sistemas inmunes innato y adaptativo, el papel del factor de necrosis tumoral α (**TNF α** , del inglés *tumor necrosis factor α*), del **IFN**, de la **IL-23** y de las respuestas de las células T colaboradoras o efectoras (**Th**, del inglés *T helper*) **17**, y la consecuente **perpetuación autoinflamatoria** en algunos pacientes y reacciones autoinmunes impulsadas por células T en otros; todo ello vinculado con la genética^{1,2,16,17}. Así, la psoriasis muestra rasgos de una enfermedad autoinmune sobre un fondo (auto)inflamatorio, con ambos mecanismos superpuestos e incluso capaces de potenciarse el uno al otro^{1,2,16,17}.

En la patogenia de la psoriasis se puede hablar de una fase de iniciación y una fase de mantenimiento que da lugar a una progresión clínica crónica^{1,2,16,17} (**Figura 3**). La **combinación** de las **variantes génicas susceptibles** con uno o varios **factores ambientales** desencadenantes marcaría el inicio del proceso patogénico. La acción de las células presentadoras de antígenos (CPAs) es la base para el inicio del desarrollo

de la placa psoriásica¹⁶⁻¹⁹, y aunque su activación en la psoriasis no está del todo clara, el proceso mayormente propuesto implica que los queratinocitos, en respuesta a una lesión u otro factor ambiental de los propuestos anteriormente, producen péptidos antimicrobianos (**PAMs**) (catelicidina LL37, β -defensinas, proteínas S100) disfuncionales, con la capacidad de romper la tolerancia innata de las CPAs ante los ácidos nucleicos extracelulares del propio individuo, liberados por las células en proceso de muerte¹⁸⁻²¹. En situaciones fisiológicas los PAMs son moléculas claves en la inmunidad innata, tienen propiedades antibióticas y actúan frente a patógenos en tejidos que requieren acciones de defensa de primera línea, como es el caso del tejido epidérmico; pero en la piel psoriásica estos péptidos forman, con el ADN propio, complejos que serán reconocidos equívocamente como antígenos (**autoantígenos**) por las CPAs^{1,20,21}. La **activación de las CPAs** es clave en la fase de iniciación, ya que desencadena los primeros estadios de la cascada inflamatoria con la secreción de diversas citocinas, siendo la producción de **TNF α** e **IFN-1** (IFN α y IFN β) la de mayor relevancia en este punto^{1,18,19}.

La señalización de TNF α e IFN tipo I promueve la maduración fenotípica de las células dendríticas (CDs) plasmocitoides a CDs mieloides^{1,18,19}. Las **CDs mieloides activadas** fagocitan a los autoantígenos^{1,18-19} y migran hasta los ganglios, donde presentan estos antígenos a los linfocitos T, activándolos. Las CDs mieloides continúan incentivando la cascada inflamatoria con la secreción de **IFN, IL-12 e IL-23**. El conjunto de citocinas induce la diferenciación y proliferación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos Th CD4+, concretamente el IFN tipo I impulsa la **diferenciación** y función de los linfocitos **Th1** y **Th17**, **IL-12** los estimula hacia **Th1** e **IL-23** es clave para la diferenciación y proliferación de **Th17** y **Th22**^{16-19,22}.

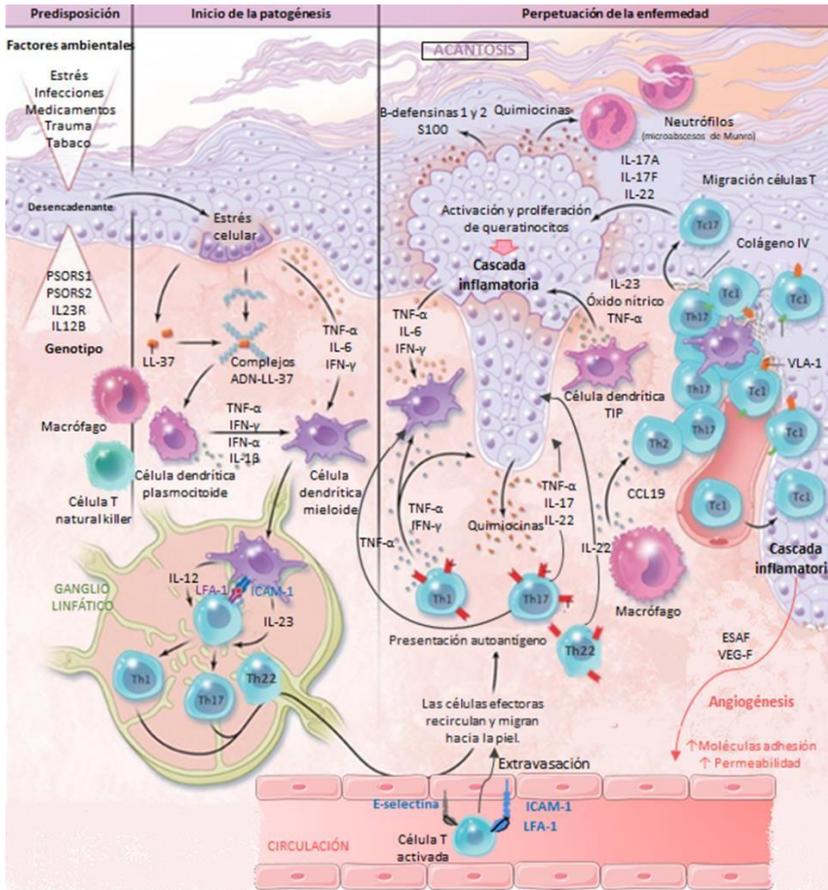


Figura 3. Fisiopatología de la psoriasis (imagen adaptada de Nestle, 2009¹⁹). Ante un desencadenante, los queratinocitos producen péptidos antimicrobianos (PAMs) (ej. LL37) alterados capaces de ocasionar que ácidos nucleicos propios sean reconocidos como antígenos por las células presentadoras de antígenos (CPAs). Las CPAs desencadenan los primeros estadios de la cascada inflamatoria con la secreción de citocinas. IFN I promueve la maduración fenotípica de las células dendríticas (CDs) mieloideas, las cuales fagocitan a los autoantígenos y los presentan a los linfocitos T. Los linfocitos T activados secretan TNFα, IL-12 e IL-23. IL-12 induce la diferenciación de Th1, IL-23 de Th17 y Th22. Los linfocitos T sensibilizados migran hacia la piel en busca de las moléculas consideradas antígenos, al reaccionar antes ellos liberan IFNγ y TNFα (Th1), IL-22 (Th22), IL-17, IL-22 y TNFα (Th17). Las citocinas desencadenan la maduración y proliferación descontrolada de los queratinocitos, el aumento de la expresión de mediadores angiogénicos (ESAF, VEG-F) y de moléculas de adhesión endoteliales (ICAM-1, E-selectina, LFA-1). Los queratinocitos activados retroalimentan la cascada inflamatoria incrementando la producción de IFNγ y secretando IL-1, IL-6, TNFα y quimiocinas y produciendo más PAMs que actúen como autoantígeno, perpetuando así el proceso de modo cíclico. ESAF: factor endotelial activador de la angiogénesis; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1; LFA-1: antagonista

del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

Los linfocitos **T**, ya sensibilizados, **migran** hacia la piel en busca de las moléculas consideradas antígenos. Para ello, pasan primero por los vasos sanguíneos gracias al aumento de la expresión de antagonista del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos (LFA-1 del inglés *lymphocyte function-associated antigen 1*)²³, molécula de adhesión que les permite unirse a su ligando, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, del inglés *Intercellular Adhesion Molecule-1*) de las células endoteliales, y extravasar hacia el tejido dérmico²³. Una vez localizados los antígenos, se produce la liberación de citocinas a nivel dérmico¹⁶⁻²⁴:

- Los linfocitos **Th1** secretan **IFN γ** y **TNF α** .
- Los linfocitos **Th22** secretan **IL-22**.
- Los linfocitos **Th17** impulsan la secreción de **IL-17**, **IL-22** y **TNF α** .

Todas estas citocinas liberadas en la dermis terminan por acceder a los **queratinocitos** de la epidermis, desencadenando su **maduración** y **proliferación descontrolada**, dando lugar a la hiperqueratosis de la epidermis propia de las lesiones psoriásicas¹⁶⁻¹⁹. Además, se ven **reducidos los niveles de células T reguladoras** (Treg) -las encargadas de suprimir la actividad del sistema inmunitario-, lo cual promueve una mayor activación de las células Th1 y Th17^{1,17}.

Una vez la cascada alcanza la epidermis son diversos los fenómenos que van a contribuir a la **perpetuación** de la patología de modo cíclico:

- **IL-17A** estimula la producción de quimiocinas provocando la quimiotaxis de **neutrófilos** hacia la epidermis²⁵; y promueve la expresión de TNF α en los queratinocitos²⁶. Ambos fenómenos son clave para la perpetuación de la inflamación en la epidermis. La liberación de IL-17

procede de la activación de las Th17 por el TNF e IL-23, por ello se considera a esta vía la principal responsable de la perpetuación de la inflamación hacia la epidermis^{2,16}. Los **neutrófilos** juegan un papel crucial en el desarrollo de la psoriasis^{27,28}, su función, fenotipo y la cantidad de neutrófilos aberrantes se encuentran alterados en estos pacientes, pueden acumularse en zonas localizadas del estrato córneo (microabscesos de Munro^{19,27}), y su actividad tras la estimulación por la IL-17A juega un papel fundamental en la perpetuación de la inflamación²⁵.

- La llegada de las citocinas a la epidermis causa también el aumento de la expresión de **mediadores angiogénicos** y de **moléculas de adhesión endoteliales**²⁹⁻³¹. Son varios los factores con propiedades proangiogénicas que se sobreexpresan en la piel psoriásica, como el TNF, factor de crecimiento transformante α (TGF α del inglés *Transforming Growth Factor α*), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), el factor endotelial activador de la angiogénesis (ESAF del inglés *Endothelial cell-Stimulating Angiogenesis Factor*), el factor inducible por hipoxia, IL-8, IL-17 y angiopoyetinas²⁹⁻³¹. Entre los factores angiogénicos con mayor aumento en la psoriasis, está el VEGF, cuyo incremento en sangre se relaciona con la gravedad de la enfermedad²⁹. VEGF es un vínculo importante entre el daño epidérmico y daño vascular, ya que promueve tanto la proliferación de los queratinocitos²⁹⁻³¹ como la neovascularización y la activación de células endoteliales, incrementa la expresión de moléculas de adhesión de los capilares en formación, aumenta su permeabilidad y favorece la migración de los leucocitos y llegada de factores proinflamatorios a la lesión²⁹⁻³¹. Su aumento prolongado junto con el de las moléculas de adhesión en la psoriasis llevan en forma directa la activación de las células endoteliales y su disfunción²⁹⁻³¹ y a la perpetuación del ciclo de inflamación y angiogénesis²⁹⁻³¹.

- Los propios **queratinocitos** activados **retroalimentan** la cascada inflamatoria incrementando la producción de IFN γ y secretando IL-1, IL-6, TNF α y quimioquinas que atraen a más CD 4^+ y células T, promoviendo su acumulación en la piel psoriásica. La propia progresión de la enfermedad se convierte en un bucle, ya que la inflamación alimenta la producción de más PAMs (ej. β -defensina 2) y la síntesis de moléculas HLA por parte de los queratinocitos epidérmicos, que actúan como superantígenos que mantienen a los linfocitos activados¹⁹.

La infiltración de células inmunitarias, más la exacerbación de la producción de citocinas por parte de los queratinocitos y la continua activación linfocitaria contribuyen a mantener y expandir la inflamación local. Es por ello que el mantenimiento de las lesiones psoriásicas se considera una respuesta inmunitaria autorreactiva persistente¹⁶⁻¹⁹. Finalmente, se produce una placa crónica caracterizada por células T citotóxicas CD 8^+ intraepidérmicas y neutrófilos, acompañada de engrosamiento epidérmico, producción de escamas y una reacción de tejido angiogénico que remodela completamente la porción de piel afectada o lesionada^{16-19,32}.

La inflamación persistente acaba por alterar la cinética celular de los queratinocitos, acortando su ciclo vital y reduciendo la frecuencia del recambio epidérmico. En condiciones fisiológicas la proporción de queratinocitos del estrato basal en fase de proliferación ronda el 70% del total, cada uno de ellos se divide por mitosis dando lugar a dos células nuevas que van madurando y ascendiendo hasta llegar al estrato córneo donde completan su queratinización, y se desprenden de la piel aproximadamente 28 días después de su nacimiento en el estrato basal. En cambio, en la piel psoriásica, la producción de células epidérmicas es hasta 7 veces mayor que la normal, completando el ciclo anteriormente

descrito en tan solo de 4 a 7 días, de modo que los queratinocitos se van acumulando y la piel se va haciendo hiperplásica, generando las placas propias de la enfermedad³³. En la histología de una placa psoriásica (**Figura 4**) se aprecia engrosamiento de la epidermis (acantosis) con alargamiento hacia abajo de las crestas epidérmicas, una capa granular adelgazada o ausente y capilares alargados y dilatados que se superponen con un infiltrado inflamatorio de células dendríticas, macrófagos y células T en la dermis y la epidermis, además de signos de neovascularización^{1,16-19,32}. En ocasiones también incluyen agrupación de neutrófilos en pústulas (micropústulas espongiiformes de Kogoj) o rodeadas de paraqueratosis (microabscesos de Munro)¹⁹.

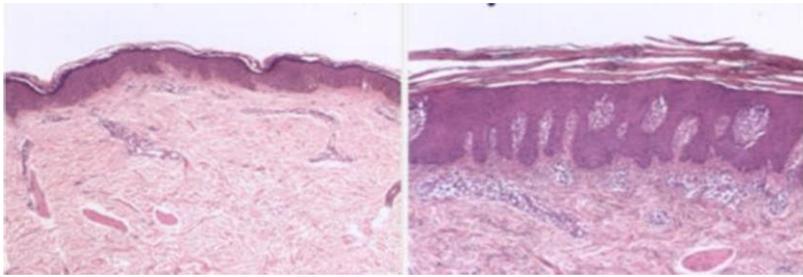


Figura 4. Afectación de las dermis y epidermis en una lesión psoriásica (imágenes de Mancheno Valencia, 2015³²). Piel sana sin alteraciones (izquierda), piel de lesión psoriásica (derecha) en la que se observa acantosis regular en la epidermis, crestas interpapilares elongadas con paraqueratosis confluyente e infiltración de células mononucleares en la dermis y epidermis.

1.4. Repercusión sistémica de la psoriasis moderada-severa.

Comorbilidades.

Son muchos los estudios y autores a lo largo de la última década que advierten que la psoriasis no es una enfermedad exclusiva de la piel, sino que debe contemplarse como una enfermedad sistémica³⁴. Existen evidencias de que la perpetuación del ambiente inflamatorio se propaga más allá de las inmediaciones de las lesiones cutáneas. A medida que avanza la patogenia de la enfermedad, el aumento de marcadores

proinflamatorios no tiene lugar solo a nivel de las lesiones de la piel, sino también en sangre, evidenciando su naturaleza sistémica. El nivel sérico de múltiples citocinas, incluyendo TNF α , IFN γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17A e IL-18, está elevado en comparación con las concentraciones halladas en individuos sanos³⁵⁻³⁷. La acumulación de neutrófilos en las placas psoriásicas y en los microabscesos viene acompañado de un aumento de estos en la circulación^{27,38}, y existen hallazgos de inflamación subclínica en el hígado, articulaciones y tendones, acompañada de un aumento significativo de la inflamación arterial y subcutánea global^{39,40}.

Aproximadamente un 73% de los pacientes que padecen psoriasis tienen una enfermedad concomitante⁴¹, presentando mayor prevalencia de artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal^{11,42,43}, diabetes mellitus, obesidad, síndrome metabólico (obesidad abdominal, hipertensión arterial, hiperglucemia y dislipemia aterogénica), **enfermedades cardiovasculares**^{11,44-47}, hígado graso no alcohólico⁴⁸, linfomas⁴⁹⁻⁵², o ansiedad y/o depresión, estando estas dos últimas relacionadas con los cambios en la calidad de vida del paciente^{1,11,53}. El riesgo de artritis psoriásica y enfermedad inflamatoria intestinal en estos pacientes deriva de la patogenia común de estas con la psoriasis^{1,2}, ya que su naturaleza sistémica facilita que los mecanismos inflamatorios involucrados lleguen a afectar a otros sistemas del organismo, desarrollándose otras enfermedades inflamatorias inmunomediadas; esto también sucede en otras enfermedades autoinmunes crónicas como la artritis reumatoide o la espondiloartritis^{11,42,43}. El ligero aumento de la prevalencia de linfomas tiene que ver con la activación persistente de los linfocitos T en la piel⁴⁹⁻⁵². Sin embargo, las comorbilidades más relevantes son aquellas cuyo nexo con la psoriasis es la inflamación crónica sistémica, como la obesidad y la diabetes –englobadas en el síndrome metabólico o independientes de este-, síndrome metabólico, **enfermedad**

cardiovascular (ECV) y esteatosis hepática, siendo estas dos últimas las **principales causas de muerte** en los pacientes con psoriasis¹².

Los mediadores inflamatorios como TNF α , ILs y otras citocinas, son grandes responsables del impacto multiorgánico de esta enfermedad. Las citocinas tienen efectos en diversos procesos, como la angiogénesis, la señalización de la insulina, la adipogénesis, el metabolismo de los lípidos y el tráfico de células del sistema inmunitario. El proceso inflamatorio en la psoriasis, aunque asintomático al inicio, incentiva la patogénesis de condiciones como obesidad, diabetes, trombosis y arteriosclerosis, pudiendo llegar a potenciarlas o incluso inducir las. Estas, a su vez, pueden influenciar la patogénesis de la psoriasis al promover el estado proinflamatorio y aumentar la propensión al desarrollo de la enfermedad^{11,54-56}, de modo que en el binomio entre la psoriasis y las enfermedades asociadas, no es posible apuntar a ninguna de ellas como causa o consecuencia, pues a día de hoy la relación es compleja y difícil de dilucidar.

2. RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON PSORIASIS MODERADA-SEVERA.

2.1. Asociación epidemiológica entre psoriasis y enfermedades cardiovasculares.

La asociación entre la psoriasis y una mayor incidencia de ECVs se conoce desde hace décadas^{11,44-47,57-60}. El primer estudio que puso de manifiesto esta relación se dio a conocer en 1973 y en él se concluía que el riesgo de enfermedad arterial y venosa era el doble si se padecía psoriasis⁶¹. A este le sucedieron múltiples ensayos para evaluar el aumento del riesgo cardiovascular en pacientes con psoriasis, y a pesar de que algunos estudios niegan la relación^{62,63}, muchos otros pudieron reproducir esta asociación^{53,64-72}. Actualmente, con base en la evidencia

disponible, la mayoría de los expertos están de acuerdo en que la asociación de la psoriasis con la comorbilidad cardiovascular es real^{46,57,73-75}.

Las ECVs engloban una serie de afecciones cardíacas que incluyen aterosclerosis, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, infarto agudo de miocardio y arritmia^{76,77}. Aunque todavía existe cierta controversia sobre las formas más leves de la enfermedad^{54,62,78}, en pacientes de psoriasis con una severidad de moderada a grave se ha observado mayor prevalencia de infarto de miocardio^{54,79}, tromboembolismo venoso⁸⁰, ictus^{80,81}, cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares⁸² y un aumento sustancial de la mortalidad cardiovascular^{3,79}.

Aunque existe cierta superposición genética entre la psoriasis y varias de las condiciones comórbidas mencionadas en el apartado anterior, la relación observada con la afección cardiovascular no puede explicarse satisfactoriamente por la genética compartida⁷³. Se ha estimado que la psoriasis grave confiere riesgo relativo de ECV en el 25% de los pacientes, **independientemente de factores tradicionales** como la hiperlipidemia, el tabaquismo y la obesidad^{53,83-87}; y un **riesgo absoluto** adicional del 6,2% de sufrir un evento adverso cardiovascular mayor (MACE, del inglés *Major Adverse Cardiovascular Event*) (ej. infarto de miocardio, ictus, muerte de causa cardiovascular) en los 10 años posteriores al diagnóstico, en comparación con la población sana^{44,88}. Sin embargo, aún hay dudas acerca de si la psoriasis *per se* es un factor de riesgo independiente de ECV¹, como así lo evidencian la mayoría de estudios^{53,83-87}.

2.2. Manifestaciones cardiovasculares en pacientes con psoriasis moderada-severa.

En los últimos años, se han desarrollado estudios con el objeto de encontrar las vías y/o células responsables de la conexión entre la psoriasis, los factores de riesgo cardiovascular y las ECV. Aunque los mecanismos patogénicos subyacentes no están claros, la alta prevalencia de **aterosclerosis**⁵⁹ y los hallazgos de aterosclerosis subclínica^{89,90} en estos pacientes, incluso en aquellos con grado leve de la afectación cutánea^{39,40,90}, apuntan a que este fenómeno podría ser el inicio del puente entre la afección cutánea y la vascular, ya que la aterosclerosis es un proceso clave en el desarrollo de ECV⁹¹⁻⁹³.

Los mecanismos moleculares y el perfil de citocinas proinflamatorias de las lesiones psoriásicas son notablemente similares a los de las lesiones vasculares ateroscleróticas (**Figura 5**), con un infiltrado inflamatorio comparable de células T, macrófagos y monocitos^{73,74,94,95}. En el primer estudio que manifestó la relación entre psoriasis, inflamación sistémica y aterosclerosis²³, se subrayaba la función endotelial alterada y la extravasación de leucocitos, principalmente linfocitos T -que ya comentamos que tenía lugar en la fisiopatología de las lesiones psoriásicas-, como un paso temprano compartido en el proceso de formación de placa en la aterosclerosis y en la psoriasis²³. Veámos anteriormente las vías inflamatorias implicadas en la psoriasis (**Figura 3**). Pues bien, en la aterosclerosis (**Figura 5**) la activación endotelial en las zonas donde se localiza la placa arterial naciente promueve la extravasación de monocitos y linfocitos y la subsiguiente liberación de IL-12 e IL-23 por macrófagos y células dendríticas. Las células Th1 diferenciadas promueven un mayor crecimiento de la placa aterosclerótica, mientras que las células Th17 promueven la formación de vasos y la hemorragia intraplaca⁹⁵.

Todos los subtipos de células T implicadas en la patogenia de la psoriasis también están implicadas en la aterosclerosis^{73,74,94-98}; siendo los **linfocitos Th1**⁹⁶⁻⁹⁸ y los **Th17**^{99,100} los que tienen el papel predominante en ambos procesos (**Figura 5**), con la consecuente liberación de mediadores de inflamación TNF α , IFN γ e ILs como IL-1 β , IL-22, IL-17^{94,101}, propias de Th1 y Th17 que se encuentran elevadas en ambas afecciones⁹⁶⁻⁹⁸.

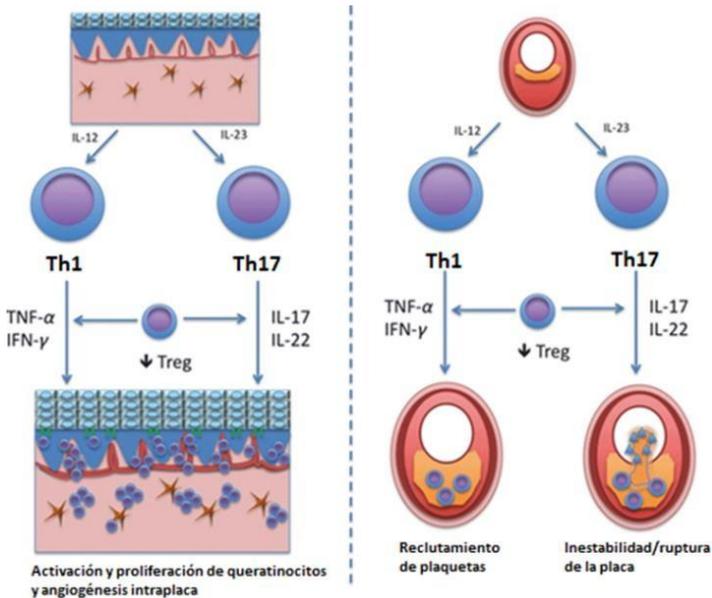


Figura 5. Mecanismos inmunológicos comunes entre la psoriasis y la aterosclerosis (imagen adaptada de Armstrong, 2011⁹⁵). IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucina; Th: linfocitos T colaboradores; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; Treg: linfocitos T reguladores.

En los estudios más recientes, se ha remarcado la importancia de la activación de la **vía Th17** y de la propia IL-17, concretamente el subtipo **IL-17A**, en el contexto de la inflamación psoriásica y aterosclerótica, llegando a relacionarse la sobreexpresión de esta citocina en las lesiones cutáneas con la existencia de un estado proaterogénico⁷⁴. Los niveles elevados de IL-17 pueden conducir a un mayor debilitamiento de la capa fibrosa, con la subsiguiente ruptura de la placa e infarto de miocardio⁹⁵. El conocimiento cada vez mayor sugiere que la vía Th17 activada

mediante IL-23 puede ser el principal vínculo entre las manifestaciones cutáneas y metabólicas de la psoriasis¹⁰².

Otra de las características compartidas por la psoriasis y la aterosclerosis es el papel relevante de las células sanguíneas. Citamos anteriormente que en la psoriasis en placa se forman acúmulos intraepidérmicos de **neutrófilos**^{19,27}; en la aterosclerosis, estos son igualmente importantes: interactúan con el endotelio dañado, aumentan el reclutamiento de leucocitos a través de la secreción de mediadores quimiotácticos y promueven el desarrollo de células espumosas, un subconjunto de macrófagos que conduce a la aterosclerosis y predicen de forma independiente la disfunción endotelial^{103,104}. La localización de neutrófilos para desarrollar placas ateroscleróticas se ha demostrado en modelos de ratón^{105,106} y lesiones ateroscleróticas humanas¹⁰⁷; su presencia en trombos oclusivos y lesiones causantes de síndrome coronario agudo sugiere un papel en la progresión aterosclerótica¹⁰⁸.

En cuanto a los **monocitos** y **macrófagos**, su participación ha sido demostrada en ambas enfermedades. Se han detectado en las lesiones psoriásicas^{28,109} y se ha demostrado su contribución activa a la propagación y exacerbación de la enfermedad¹¹⁰. Con respecto a la aterosclerosis, en general, los macrófagos inflamatorios llevan a cabo procesos que promueven su progresión, incluida la necrosis de la placa y el adelgazamiento de una capa protectora fibrosa^{111,112}, aunque también llevan a cabo funciones que pueden suprimir la progresión de la placa y promover su regresión¹¹².

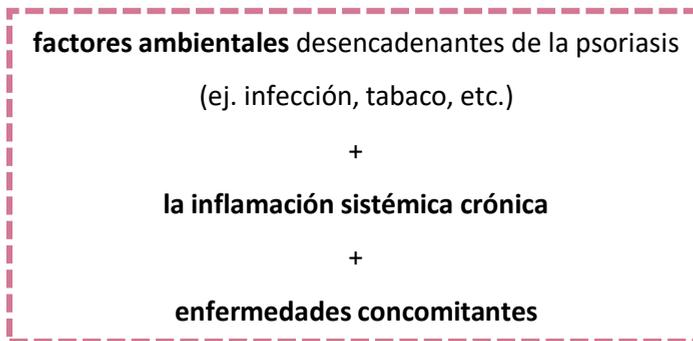
Por último, las **plaquetas** también parecen contribuir activamente en ambas patologías. Cada vez se reconoce más su participación en los procesos inmunitarios e inflamatorios¹¹³. De hecho, los pacientes con psoriasis tienen niveles elevados de marcadores de activación plaquetaria

(hiperagregabilidad plaquetaria espontánea, volumen plaquetario medio, niveles plasmáticos de P-selectina)^{114,115}. La combinación de diversos índices de activación plaquetaria ayudar a predecir la gravedad de la psoriasis¹¹⁴. Mecánísticamente, se cree que las plaquetas activadas facilitan la extravasación de leucocitos¹¹⁶ y es esa capacidad la que las vincula con la aterosclerosis^{117,118}. Además, su relevancia clínica en las manifestaciones de ECV es evidente, ya que los fármacos inhibidores de plaquetas son efectivos en el tratamiento y la prevención de episodios tromboembólicos arteriales agudos¹¹⁹.

La identificación de las similitudes y mecanismos compartidos entre la formación de la placa psoriática y la aterosclerótica evidencia por qué ambas afecciones se retroalimentan mutuamente y coexisten con frecuencia en un mismo individuo, pero si la afección vascular es una consecuencia del proceso cutáneo o una manifestación acompañante de la enfermedad es tema de debate. Analizar la existencia de mecanismos por los que la psoriasis moderada-severa desemboca de forma directa en aterosclerosis y consecuentes ECVs, ayudaría a generar herramientas para detener el daño vascular en estos pacientes.

2.2.1. Desarrollo de aterosclerosis en pacientes con psoriasis moderada-severa.

La aterosclerosis es un fenómeno impulsado por la inflamación^{74,120}, por lo que hace más de una década se propuso el carácter inflamatorio de la psoriasis como nexo entre la afección cutánea y el desarrollo de aterosclerosis²³. La hipótesis mecanística más apoyada por la evidencia para explicar la capacidad de la psoriasis de actuar como riesgo cardiovascular independiente se conoce comúnmente como **marcha psoriásica** y propone que la suma de:



resulta en el desarrollo de **resistencia a la insulina**. Esta resistencia insulínica posteriormente induce **disfunción endotelial** de los vasos sanguíneos, que daría lugar al endurecimiento de los mismos y a la formación de aterosclerosis que, en última instancia, podría desembocar en un evento cardiovascular^{73,121,122}. A su vez, los tres sumandos, a través de los mecanismos compartidos y su base inflamatoria, podrían retroalimentarse entre sí¹. Este concepto va en consonancia con el hecho de que la inflamación persistente que implica la psoriasis va más allá de la piel y que es capaz de involucrar múltiples mecanismos sistémicos que la convierten en un **factor de riesgo cardiovascular independiente**.

La **resistencia a la insulina** es un componente destacado de los trastornos cardiovasculares por su implicación en la generación de

disfunción endotelial^{123,124}. Son múltiples los estudios que han evidenciado la presencia clínica de resistencia a la insulina^{125,126} con su consecuente disfunción endotelial¹²⁷⁻¹³⁰, en los pacientes con psoriasis. Además, se ha observado que, junto a los marcadores clásicos de inflamación, en estos pacientes también se hallan elevadas las adipocinas a niveles similares a los de los individuos prediabéticos^{125,131}. La insulina tiene un papel relevante en la homeostasis vascular^{132,133}, la perpetuación de la inflamación que experimentan los pacientes con psoriasis da lugar a **citocinas, adipocinas** y factores angiogénicos que, generados en exceso, son capaces de actuar como antagonistas de esta¹³²⁻¹³⁶ (**Figura 6**), provocando así la resistencia a la insulina, siendo el TNF α y la IL-6 los principales responsables de este efecto^{134,135} (**Figura 6**).

Las adipocinas en general y la leptina en particular, además de obstaculizar las funciones de la insulina, pueden impulsar la aterosclerosis a través de la inmunomodulación directa en el tejido vascular^{135,136}, por ejemplo, sobre las moléculas de adhesión (**Figura 6**) y a su vez promueven aún más la expresión de citocinas proinflamatorias¹⁰⁴. Se ha demostrado que la elevación de la leptina en los pacientes con psoriasis se correlaciona con la gravedad de la enfermedad cutánea y con índices de aterosclerosis subclínica¹⁰⁴. La disfunción del endotelio a la que desemboca la resistencia a la insulina se traduce en un aumento de la permeabilidad de este a partículas lipídicas y extravasación de leucocitos, facilitando así la formación de placas de ateroma¹³⁷ (**Figura 7**) que, a su vez, contribuyen a la liberación de más mediadores inflamatorios y metaloproteinasas de matriz¹³⁷ que perpetúan la inflamación.

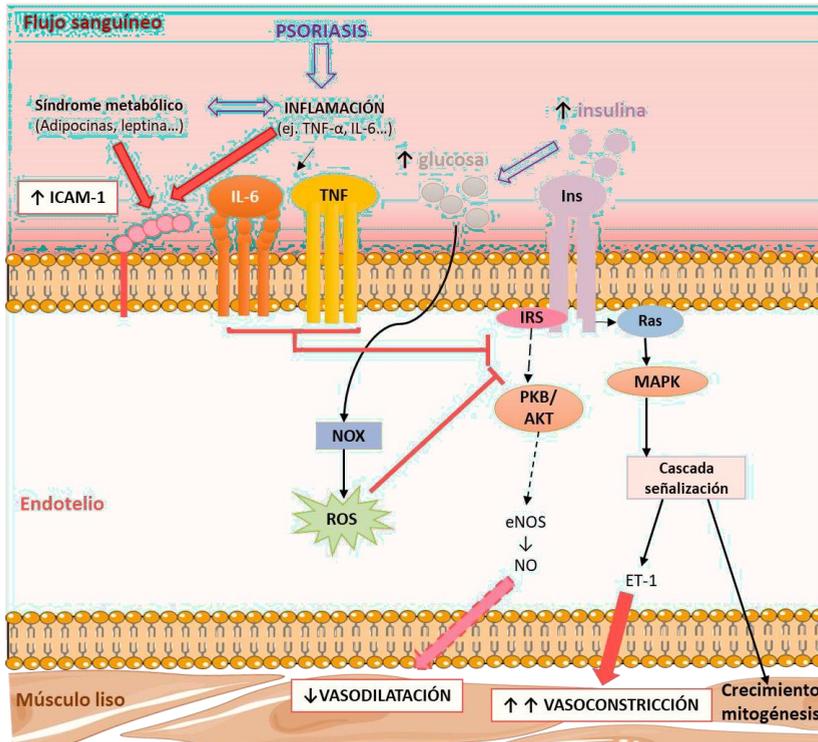


Figura 6. Desarrollo de disfunción endotelial a causa de la resistencia a la insulina. eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ET-1: endotelina 1; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular; Ins: insulina; IRS: sustrato del receptor de insulina; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; NO: óxido nítrico; NOX: NADPH oxidasa; PKB/AKT: proteína quinasa B; Ras: proteína monomérica de la familia de las proteínas G; ROS: especies reactivas de oxígeno.

A la resistencia a la insulina se le suman las **anomalías lipídicas** presentes en estos pacientes, tanto cuantitativas como funcionales^{138,139}. Los niveles medios de LDL oxidada (LDL_{ox}) en pacientes con psoriasis son significativamente más altos que los de los controles sanos¹⁴⁰, lo que muestra que la dislipemia que presentan los pacientes psoriásicos es aterogénica. Las anomalías incluyen alteración de la capacidad de transporte inverso de colesterol de las HDL¹³⁹ lo que, en combinación con la inflamación crónica, aceleran la enfermedad vascular aterosclerótica¹³⁵ (**Figura 7**).

Un tercer mecanismo directo propuesto entre la psoriasis y el desarrollo de aterosclerosis es la generación de **tejido adiposo epicárdico**¹⁰⁴ (Figura 7), ya que se ha informado que su presencia está aumentada significativamente en pacientes con psoriasis, y este es fuente adicional de depósito de grasa visceral y de citocinas inflamatorias que están asociadas con la enfermedad coronaria tanto subclínica como clínica¹⁰⁴.

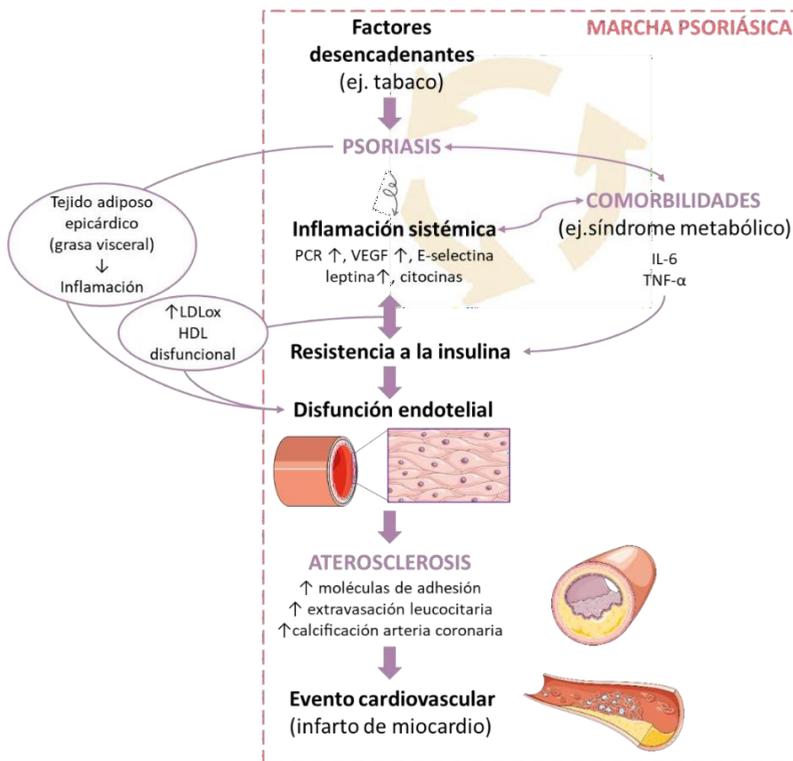


Figura 7. Mecanismos implicados en el desarrollo de aterosclerosis en pacientes con psoriasis moderada-grave. Marcha psoriásica. HDL: lipoproteína de alta densidad; IL: interleucina; LDLox: lipoproteína de baja densidad oxidada; PCR: proteína C reactiva; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

Una vez la capa de ateroma se establece en los pacientes psoriásicos, son varios los factores que pueden promover el paso de su fenotipo estable a uno inestable^{137,141,142}, entre ellos, el ambiente

inflamatorio, capaz de activar las metaloproteínas de la matriz y la apoptosis o necrosis celular contribuyendo a la desestabilización de la placa^{143,144}. De modo que la condición inflamatoria que envuelve a la psoriasis moderada-grave es un factor primordial tanto en el desarrollo de las placas ateroscleróticas como en su posterior desestabilización, aumentando el riesgo de ruptura y formación de procesos trombóticos, que en última instancia pueden desembocar en eventos cardiovasculares como infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

3. PROCESO INFLAMATORIO Y TROMBÓTICO.

3.1. Interacción leucocito-endotelio.

El proceso inflamatorio asociado con patologías como aterosclerosis, infarto de miocardio o procesos de isquemia-reperfusión, se caracteriza por una acumulación excesiva de células leucocitarias en el endotelio vascular¹⁴⁵. El endotelio vascular es una monocapa continua de células que cubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos y que separa la sangre del tejido subendotelial. Es un tejido metabólicamente activo que interacciona con otras células y factores humorales regulando el tono vascular y la permeabilidad, el tráfico leucocitario, la agregación plaquetaria, la coagulación, la fibrinólisis y la angiogénesis. Cuando el endotelio es dañado, este reponde generando una respuesta inflamatoria localizada mediada por la acumulación leucocitaria, adhesión y agregación plaquetaria y activación de la coagulación sanguínea, que puede dar lugar a procesos trombóticos¹⁴⁵.

A nivel vascular, uno de los primeros estadios del proceso inflamatorio lo constituye la interacción entre las moléculas de adhesión del endotelio vascular y sus correspondientes ligandos existentes en la célula leucocitaria implicada¹⁴⁶. Este proceso puede ser inducido por diferentes estímulos y da lugar a la extravasación de leucocitos desde el

torrente circulatorio hasta el foco inflamado¹⁴⁶. La interacción de los leucocitos con las células endoteliales está mediada por una cascada secuencial de reacciones reversibles y transitorias entre estos dos tipos de células¹⁴⁷ (**Figura 8**). Las responsables últimas del acercamiento entre leucocitos y endotelio son las moléculas de adhesión celular, principalmente las integrinas y selectinas leucocitarias y sus correspondientes ligandos endoteliales, inmunoglobulinas y selectinas, respectivamente (**Tabla 1**). La mayoría de moléculas de adhesión son constitutivas, pero además su expresión y/o su activación en la superficie celular de las células endoteliales puede ser estimulada en respuesta a citocinas de carácter inflamatorio u otros estímulos proinflamatorios¹⁴⁸.

Tabla 1. Moléculas de adhesión principalmente implicadas en la interacción leucocito-endotelio.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN			
Leucocitarias		Endoteliales	
Integrinas $\beta 2$	LFA-1 (CD11a/CD18) En la mayoría de los leucocitos	ICAM-1	Superfamilia de las inmunoglobulinas
	Mac-1 (CD11b/CD18) Neutrófilos y monocitos		
	CR4 (CD11c/CD18) Linfocitos, monocitos y eosinófilos		
Integrinas $\beta 1$	VLA-4 (CD49/CD29) Monocitos y linfocitos	VCAM-1	
Selectinas	L-selectina (CD62L)	E-selectina	Selectinas
		P-selectina	

LFA-1 (CD11a/CD18) se une a otros leucocitos y media la adhesión firme al endotelio a través de ICAM-1 e ICAM-2; Mac-1 (CD11b/CD18) en neutrófilos y monocitos se une directamente al endotelio a través de ICAM-1; VLA-4 (CD49d/CD29) en linfocitos, monocitos y eosinófilos tiene afinidad por VCAM-1; y, L-selectina, por E-selectina. CR4: complemento del receptor 4; ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular 1; LFA-1: antagonista del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos; Mac-1: moléculas de adhesión celular 1; VCAM-1: moléculas de adhesión celular vascular 1; VLA-4: antígenos de activación tardía 4.

En la **Tabla 1** se pueden observar las moléculas de adhesión más relevantes en la interacción leucocito-endotelio. Entre las **integrinas leucocitarias** distinguimos la familia de las integrinas $\beta 1$, también

llamadas antígenos de activación tardía (VLA, del inglés *Very Late Antigen*) y las integrinas $\beta 2$ ¹⁴⁹. Las **integrinas $\beta 1$** contienen la subunidad $\beta 1$ (CD29) apareada a las diferentes subunidades α (CD49a-f), en este grupo destaca la acción de la integrina conocida como antígeno de activación tardía 4 (VLA-4, del inglés “*very late antigen 4*”). Las **integrinas $\beta 2$** incluyen LFA-1, la molécula de adhesión celular 1 (Mac-1) y el complemento del receptor 4 (CR4), comparten una subunidad β común (CD18) y una subunidad α (CD11) específica para cada una de ellas, CD11a para LFA-1, CD11b para Mac-1 y CD11c para CR4¹⁴⁹. Estas integrinas regulan sus propiedades adhesivas mediante cambios conformacionales que condicionan su afinidad por sus diferentes ligandos -baja, media o alta afinidad^{-149,150}. En situación de alta afinidad mantienen su conformación extendida, pudiendo unirse a los ligandos endoteliales. Ambos tipos de integrinas son constitutivas y aparte pueden aumentar su expresión y/o, en el caso de las $\beta 2$, modificar su conformación ante determinados estímulos inflamatorios. Los **ligandos endoteliales** de las integrinas son las **moléculas de adhesión intercelulares ICAM-1** e **ICAM-2** y las **moléculas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1)**, del inglés *Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*)¹⁴⁹. Por otro lado, tenemos las **selectinas**, con un importante papel en las primeras etapas del proceso de enlentecimiento de los leucocitos sobre el endotelio. Los leucocitos tienen L-selectina y sus posibles ligandos endoteliales son E y P-selectina. En el caso de L-selectina, esta es excretada de la superficie de los neutrófilos cuando son activados^{147,151}. E y P-selectina solo se hallan en moléculas endoteliales activadas¹⁴⁷.

Inicialmente, en respuesta a un daño previo, se incentiva la expresión de mediadores que producen una rápida activación de leucocitos y/o de células endoteliales resultando en el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión que actúan secuencialmente

iniciando enlaces que conducen a un enlentecimiento de la velocidad de los leucocitos y a un incremento de su contacto con el endotelio¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ (**Figura 8**). En esta etapa participa fundamentalmente la familia de las selectinas leucocitarias (**L-selectina**) y endoteliales (**P-selectina** y **E-selectina**)¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Una vez en contacto cercano con el endotelio, los leucocitos comienzan el proceso de deceleración conocido como **RODAMIENTO LEUCOCITARIO**. En esta etapa van a participar, mayoritariamente, las integrinas $\alpha 4$ (**VLA-4**), que interactúan principalmente con **VCAM-1**, y las integrinas $\beta 2$ **LFA-1** que interactúan en mayor medida con **ICAM-1**¹⁵⁰ (**Figura 8**). Si el estímulo persiste, los leucocitos en fase de rodamiento se activan, se adhieren firmemente al endotelio, difunden a través de la superficie celular y migran a través de la monocapa de células endoteliales¹⁵². Así, el siguiente paso en la cascada es la transición de los leucocitos enlentecidos a adheridos. La **ADHESIÓN FIRME** se produce por interacciones entre integrinas leucocitarias activas e inmunoglobulinas endoteliales sobreexpresadas a causa de la disfunción endotelial, dando lugar a una adhesión célula-célula próxima y estable. A nivel endotelial, los ligandos de las integrinas van a aumentar su expresión cuando el endotelio se active, aunque estas moléculas se encuentran expresadas de forma constitutiva en el endotelio y pueden interactuar con sus ligandos leucocitarios sin que se produzca una activación endotelial previa. Tras producirse la unión, las integrinas van a generar multitud de señales intracelulares que van a iniciar gran cantidad de rutas de señalización celular, que conllevarán a una fase de post-adhesión y estabilización, llegando a la fase conocida como fortalecimiento de la adhesión¹⁵⁰. En este proceso de adhesión estable va a tener mucha importancia el complejo formado por **Mac-1/ICAM-1**¹⁵⁰ (**Figura 8**). El último paso es la **MIGRACIÓN** leucocitaria a través de las uniones entre células endoteliales y a través de la membrana basal perivascular

(Figura 8). Los leucocitos activados, una vez han migrado a través de la barrera endotelial, deben atravesar la matriz extracelular y dirigirse hacia el lugar de la infección o inflamación extravascular¹⁴⁶.

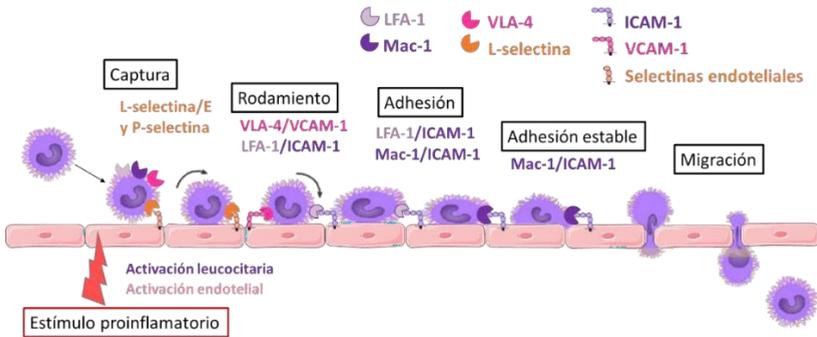


Figura 8. Etapas del proceso de interacción leucocito-endotelio (imagen adaptada de Ley, 2007¹⁵⁰). Un estímulo proinflamatorio es capaz de incentivar la activación de leucocitos y/o células endoteliales. La interacción entre leucocitos y endotelio es un proceso secuencial, comienza con el entencimiento de la velocidad de los leucocitos, en el que participan las selectinas leucocitarias y endoteliales. Cuando el leucocito entra en fase de rodamiento, participan las integrinas $\alpha 4$ (VLA-4) leucocitarias que interaccionan con VCAM-1 endotelial y las integrinas $\beta 2$ LFA-1 que interaccionan en mayor medida con ICAM-1. Si el estímulo persiste, los leucocitos se adhieren al endotelio gracias a la interacción LFA-1/ICAM-1 y Mac-1/ICAM-1 endotelial. El complejo Mac-1/ICAM-1 será muy relevante para dar a la adhesión un carácter firme. El último paso es la migración leucocitaria. CR4: complemento del receptor 4; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; LFA-1: antagonista del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos; Mac-1: molécula de adhesión celular 1; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1; VLA-4: antígenos de activación tardía 4.

3.2. Proceso trombótico.

La inflamación tiene un papel fisiológico esencial, pero su perpetuación en la vasculatura es capaz de romper el equilibrio homeostático entre los factores procoagulantes, los anticoagulantes y la fibrinólisis, promoviendo la formación de placa aterosclerótica y/o su ruptura o fisura, estimulando el **proceso trombótico**^{93,104,152}, el cual constituye el mecanismo subyacente común al desarrollo en las principales ECVs⁹³. Las interacciones leucocito-endotelio son cruciales

para iniciar y propagar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, en las que aumenta el riesgo de generarse trombosis arterial^{93,152}.

A nivel celular, los trombos arteriales se componen principalmente de plaquetas agregadas con capacidad para adherirse a la pared del vaso lesionado (adhesión plaquetaria) y a otras plaquetas activadas (agregación plaquetaria)¹⁵⁰. Las plaquetas activadas enlentecen su rodamiento sobre la monocapa de células endoteliales a través de la interacción entre los receptores plaquetarios y sus ligandos endoteliales, y comienzan a reclutar a otras plaquetas y leucocitos en circulación mediante la liberación de una serie de mediadores como ADP/ATP, tromboxano A2 y trombina, amplificando el proceso aterotrombótico¹⁵⁰. La adhesión de las plaquetas al endotelio venular y arterial en procesos inflamatorios agudos está mediada por P-selectina¹¹⁷, la cual, además de en el endotelio, se expresa en gránulos intracitoplasmáticos de plaquetas, y, al activarse, es trasladada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos en diversos tipos celulares^{147,151}. La unión de las plaquetas con los leucocitos se produce mediante la interacción de P-selectina plaquetaria y el ligando glicoproteico-1 de la P-selectina (PSGL-1) leucocitario, y se estabiliza gracias a la interacción entre el complejo glicoproteico Ib α (GPIb α) plaquetario y Mac-1 leucocitaria¹⁵³. Los leucocitos ruedan sobre las plaquetas a través de la interacción PSGL-1/P-selectina y posteriormente se unen a través de Mac-1, interaccionando con receptores presentes en la membrana plaquetaria como el complejo glicoproteico GPIb α o ICAM-2¹¹⁷. Las interacciones adhesivas entre las plaquetas y las células endoteliales en los sitios propensos a la aterosclerosis pueden mejorar el reclutamiento y la activación de los monocitos proaterogénicos⁹². A través de la liberación de moléculas proinflamatorias y moduladores de la respuesta biológica, la interacción entre plaquetas, células endoteliales y leucocitos establece

una respuesta inflamatoria localizada que puede acelerar, a su vez, la formación temprana de sucesivas lesiones ateroscleróticas⁹².

4. IMPLICACIÓN DEL TRATAMIENTO SISTÉMICO DE LA PSORIASIS MODERADA-SEVERA SOBRE LA COMORBILIDAD CARDIOVASCULAR.

4.1. Tratamiento de la psoriasis.

Actualmente no existe una cura para la psoriasis, sino que, al ser una afección crónica con etapas de remisión y periodos de exacerbación o brotes, el objetivo del tratamiento es hacer desaparecer en la medida de lo posible las lesiones cutáneas, y mantener la enfermedad en período de remisión, así como controlar la inflamación sistémica a largo plazo y la aparición y/o progresión de sus comorbilidades, todo ello con los menores efectos secundarios posibles¹⁵⁴. Según el Programa de Consenso Europeo¹⁵⁵, el tratamiento se considera exitoso si hay una mejora del 75% o más del PASI (conocida como respuesta PASI 75), y un fracaso si no logra un PASI de 50. Si la mejora queda entre el 50 y el 75% pero logra una puntuación DLQI igual o inferior a 5 también se considera éxito, mientras que si la puntuación DLQI se mantiene superior a 5 se considera fracaso del tratamiento.

En todos los casos de psoriasis se recomienda incluir un enfoque terapéutico no farmacológico como coadyuvante al tratamiento de base, independientemente de la severidad. Este incluye hábitos de vida saludables, medidas higiénico-cosméticas de cuidado de la piel y uso de compuestos emolientes y/o hidratantes para evitar la sequedad, descamación e irritación de la piel^{1,156}. Las estrategias farmacológicas pueden clasificarse en 3 grandes grupos: el tratamiento farmacológico tópico, tratamiento sistémico con fototerapia o fotoquimioterapia y el tratamiento sistémico farmacológico; que pueden usarse en monoterapia

o combinados³. La elección de la terapia depende de la severidad, de la presencia de enfermedades concomitantes, la respuesta a tratamientos previos, intolerancias, expectativas del paciente e incluso del acceso a la atención médica^{3,157}.

El **tratamiento tópico** con glucocorticoides y/o análogos de la vitamina D o inhibidores tópicos de la calcineurina, principalmente, está indicado para las formas leves de la enfermedad o asociado a terapias sistémicas en las formas de mayor gravedad. La **fototerapia** se considera un tratamiento sistémico basado en el efecto antiinflamatorio y antiproliferativo de la radiación ultravioleta. Consiste en la exposición del paciente a dicha irradiación en cabinas especializadas 2 a 3 veces por semana. Puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos tópicos o sistémicos, como el psoraleno, que pretenden sensibilizar la piel para aumentar la eficacia del tratamiento, en cuyo caso hablaríamos de fotoquimioterapia (por ejemplo, terapia basada en psoralenos más radiación ultravioleta A [PUVA]), que se suele recomendar en pacientes con psoriasis de moderada a severa. Hay un gran porcentaje de pacientes con psoriasis de moderada a grave que requerirán **tratamiento sistémico farmacológico**^{3,8,16}. Las opciones de este grupo son:

- Moléculas de pequeño tamaño vía oral: agentes inmunosupresores sistémicos (metotrexato, ciclosporina y apremilast), ésteres del ácido fumárico, acitretina.
- Fármacos biológicos que actúan contra el TNF α (adalimumab, etanercept, infliximab, certolizumab), contra las IL-12 y 23 (ustekinumab), la IL-17 (secukinumab, brodalumab e ixekizumab) o contra la IL-23 (guselkumab, tildrakizumab y risankizumab)¹⁵⁸.

4.1.1. Terapias sistémicas con pequeñas moléculas.

Los agentes terapéuticos de este grupo son de administración oral, con la excepción de metotrexato, que también está disponible para administración subcutánea. El metotrexato, la ciclosporina y la acitretina son considerados terapias inmunomoduladoras convencionales, puesto que llevan usándose para esta indicación más de 25 años. Como moléculas pequeñas de posterior incorporación tenemos apremilast, incluido en 2015¹⁰. Hay guías que también incluyen en este grupo los ésteres del ácido fumárico, ya que se aprobaron hace más de 25 años en Alemania, pero no ha sido hasta 2017 que se ha aprobado su uso clínico en Europa.

- **Metotrexato (MTX):**

Análogo del ácido fólico que inhibe la dihidrofolato reductasa bloqueando la biosíntesis de purinas y con ello la proliferación celular. En el caso del tratamiento de la psoriasis, es efectivo a concentraciones que no llegan a inhibir la proliferación de los queratinocitos, con que su mecanismo antiinflamatorio completo aún está en proceso de esclarecerse, pero probablemente esté relacionado con sus efectos sobre las células T, alterando el balance entre los linfocitos Th y los Treg, lo que reduciría la formación de factores proinflamatorios, metaloproteinasas y especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁵⁹⁻¹⁶³. Estudios recientes apuntan a que esto lo podría llevar a cabo regulando al alza los niveles de adenosina¹⁶³⁻¹⁶⁶, un nucleósido de purina ubicuo con propiedades antiinflamatorias¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Un estudio retrospectivo reciente informó que el 33%, 47% y 64% de los pacientes alcanzaron una respuesta exitosa al tratamiento a los tres, seis y doce meses, respectivamente¹⁶⁷. Sus posibles efectos secundarios más comunes son a nivel gastrointestinal, leucopenia, fibrosis pulmonar y elevación de las transaminasas hepáticas, la intolerancia por parte de algunos pacientes y su teratotoxicidad. A pesar

de ellos, sigue siendo un fármaco de primera línea y de uso frecuente, el estrecho seguimiento de la función hepática y el recuento sanguíneo completo hacen factible una administración a largo plazo¹⁶.

- **Ciclosporina:**

Inhibidor de la calcineurina, con lo que consigue una reducción de la transcripción de la IL-2, y con ello la inhibición de la estimulación y diferenciación de los linfocitos Th. Su efecto inmunosupresor es rápido y reversible, con lo que es capaz de reducir rápidamente la severidad de las lesiones, por eso se emplea como terapia intermitente a corto plazo inductora de remisión de la enfermedad. Como terapia de mantenimiento se recomienda solo hasta un máximo de dos años porque sus potenciales efectos secundarios son importantes (hipertensión, linfoma, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad), y algunos de ellos, en especial la nefrotoxicidad, dependientes de la duración del tratamiento y de la dosis^{168,169}.

- **Acitretina:**

Retinoide –molécula análoga de la vitamina A- que normaliza la proliferación y diferenciación de los queratinocitos mediante la unión al receptor de retinoides^{170,171}. La querilitis es el efecto secundario más común que aparece de forma dosis-dependiente en todos los pacientes. Otros efectos adversos incluyen conjuntivitis, efluvio, hepatitis y teratogenicidad¹⁶. Es mejor evitar el tratamiento con retinoides en mujeres en edad fértil debido a los riesgos para el feto en desarrollo y la necesidad de utilizar métodos anticonceptivos dos años después de la interrupción del tratamiento.

- **Ésteres de ácido fumárico (EAF):**

Pequeñas moléculas con propiedades inmunomoduladoras e antiinflamatorias^{172,173}. No se conoce con exactitud su mecanismo, pero

se cree que implica una interacción con el glutatión, que, entre otros mecanismos, inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B promoviendo un cambio de respuesta proinflamatoria vía Th1/Th17 a una respuesta antiinflamatoria reguladora Th2^{174,175}. Su uso por vía oral, en forma de combinación de dimetilfumarato y monoetilfumarato (DMF/MEF), está autorizado únicamente en Alemania, para el tratamiento de la psoriasis grave y también la moderada, donde es un fármaco de primera línea¹⁷⁶; en 2017 se reformuló exclusivamente con DMF y fue aprobado para el tratamiento de la psoriasis en la Unión Europea, Islandia y Noruega¹⁰.

- **Apremilast:**

Es un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4), con lo que consigue reducir la expresión de TNF α , IFN γ , IL-17 e IL-23, entre otras, e incrementar IL-10. Además, se ha demostrado que tiene amplios efectos antiinflamatorios sobre queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales¹⁷⁷. Es el primer medicamento de su grupo farmacológico aprobado en España para el tratamiento de la psoriasis, aunque debido a su modesto perfil de eficacia observado hasta la fecha queda destinado a los casos de pacientes que tienen contraindicado o no toleran otros tratamientos sistémicos o la fototerapia¹⁷⁸. Su principal ventaja respecto a los anteriores es que no es necesario realizar ajuste de dosis en pacientes de edad avanzada, insuficiencia hepática o en aquellos con insuficiencia renal leve o moderada, ni requiere una monitorización rutinaria de los parámetros hematológicos. Los eventos adversos más comunes fueron a nivel de tracto gastrointestinal (náuseas y diarrea) y tracto respiratorio superior (infecciones y nasofaringitis), fueron de naturaleza leve y se resolvieron espontáneamente¹⁶. No debe combinarse con biológicos¹⁷⁹.

En general, las terapias convencionales requieren un estrecho seguimiento clínico debido a los efectos secundarios frecuentes que

afectan principalmente al riñón y al hígado. Los posibles efectos secundarios de EAF y apremilast no suelen poner en peligro la vida, pero pueden ser suficientes para justificar la interrupción¹⁶.

4.1.2. Terapias sistémicas biológicas con anticuerpos monoclonales.

Los medicamentos biológicos se definen como aquellos cuyo principio activo se obtiene a partir de células u organismos vivos o de sustancias procedentes de éstos (o sus versiones producidas en el laboratorio)¹⁸⁰. La mayoría de medicamentos biológicos de uso clínico actual contienen sustancias activas hechas de proteínas, de tamaño y complejidad variables, abarcando desde proteínas simples como la insulina o la hormona del crecimiento hasta otras más complejas como los factores de coagulación o los anticuerpos monoclonales¹⁸⁰.

En los últimos 15 años han empezado a incorporarse este tipo de agentes biológicos al arsenal terapéutico de la psoriasis, revolucionando su tratamiento gracias a su excelente perfil de eficacia, seguridad y tolerabilidad^{156,181}, respaldado por múltiples estudios a largo plazo en reumatología, gastroenterología y dermatología. Al contrario de lo que ocurre con otros tratamientos sistémicos convencionales, ninguno de los medicamentos biológicos se ha asociado con efectos adversos específicos para un órgano, sin embargo, su uso se sigue viendo limitado por su elevado coste¹⁵⁶.

Los fármacos biológicos utilizados para la psoriasis son en su mayoría anticuerpos monoclonales que actúan sobre vías inflamatorias específicas y se administran por vía subcutánea (a excepción de infliximab, que es de administración intravenosa) en diferentes programas semanales. En general, en el tratamiento de las enfermedades inmunomediadas los fármacos empleados tendrán efecto

inmunosupresor total o parcial, por lo que habrá que tener cuidado en los pacientes con infecciones activas. Actualmente, los productos biológicos incluidos en el esquema terapéutico de la psoriasis se dirigen a dos vías cruciales en el desarrollo y la cronicidad de la placa psoriásica: la señalización de TNF α y del eje IL-23/Th17^{16,181-183}.

4.1.2.1. Señalización TNF α : biológicos anti-TNF α .

Los inhibidores de TNF α son los que más tiempo llevan en uso, para esta y otras patologías, por lo que se consideran fármacos biológicos de primera generación. Actualmente hay cuatro medicamentos en esta categoría: **adalimumab (ADA)**, **etanercept (ETA)**, **infliximab (INF)** y **certolizumab**^{6,179,184} (Tabla 2).

Tabla 2. Fármacos biológicos inhibidores de TNF α .

Nombre	Tipo	Mecanismo	Vía de administración
Etanercept (uso clínico para psoriasis en Europa desde 2004)	Proteína de fusión humana recombinante obtenida de la fusión de la porción del receptor de TNF que actúa como ligando del TNF α con la porción constante de un anticuerpo IgG1, (es el único que no es un AcM).	Inhibición competitiva de la unión del TNF al TNFR de la superficie celular impidiendo la respuesta celular mediada por el TNF provocando que el TNF sea biológicamente inactivo. Actuaría como un "falso receptor" del TNF α .	Subcutánea.
Adalimumab (2007)	Anticuerpo IgG1 monoclonal completamente humano recombinante contra TNF α .	Neutralizan la actividad del TNF α al unirse a su forma soluble y unida a la membrana.	Subcutánea.
Infliximab (2005)	Anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico murino-humano recombinante contra TNF α .		Perfusión intravenosa lenta (mín. 2 horas) durante 2 horas).
Certolizumab pegol (2018)	Fragmento de la fracción de unión al antígeno (sin región constante) de un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra TNF α , conjugado con polietilenglicol.		Subcutánea.

AcM: anticuerpo monoclonal; Ig: inmunoglobulina; TNFR: receptor de TNF.

Los anti-TNF α muestran diferentes tasas de respuesta PASI 75: 52% para etanercept, 59% para adalimumab y 80% para infliximab¹⁸⁵. **Etanercept** fue el primer inhibidor de TNF α aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos para la psoriasis¹⁷⁹;

mientras que en España fue **adalimumab** el primer inhibidor de este grupo en recibir la autorización para el uso en primera línea de adultos con psoriasis en placas moderada a grave que son candidatos para terapia sistémica. La naturaleza quimérica del **infliximab** podría contribuir a un mayor potencial inmunogénico del fármaco, lo que a su vez podría influir en la supervivencia del fármaco¹⁸⁶, por lo que en su caso la duración máxima del tratamiento es limitada a un año. Además, su vía de administración impide su administración domiciliaria. A **certolizumab pegol** la conjugación con polietilenglicol le atribuye una serie de mejoras biofarmacéuticas que incluyen una vida media aumentada y una inmunogenicidad reducida¹⁸⁷. A diferencia de otros agentes anti-TNF α , no se transporta activamente a través de la placenta, por lo que posee la gran ventaja de estar aprobado para su uso durante el embarazo y la lactancia^{16,179}.

Los efectos adversos más frecuentes en este grupo son infecciones leves, diarrea, rash cutáneo y reacciones en el punto de inyección. Dentro de los más graves encontramos la reactivación de infecciones latentes como la hepatitis B y C o tuberculosis, lupus inducido por fármacos, trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central y reacciones paradójicas como psoriasis y lesiones cutáneas psoriasiformes^{179,188,189}. En cuanto al caso concreto de la tuberculosis, su riesgo de reactivación se considera mayor con terapias biológicas anti-TNF α , que con el resto de terapias biológicas que veremos a continuación¹⁹⁰. Infliximab y etanercept se han asociado con un empeoramiento de la insuficiencia cardíaca preexistente y, en consecuencia, los bloqueadores del TNF están contraindicados en pacientes con insuficiencia cardíaca grave (clase III o IV de la *New York Heart Association*). Los pacientes con enfermedades menos graves deben ser controlados cuidadosamente y sometidos a un seguimiento regular por un cardiólogo¹⁰.

4.1.2.2. Señalización en el eje IL-23/Th17.

Como se ha descrito, en la patogenia de la psoriasis la citocina IL-23 es clave para la diferenciación y proliferación de Th17 y Th22, y la IL-17 liberada por los linfocitos Th17 es de gran relevancia en el desarrollo de las lesiones. Actualmente, se encuentran disponibles tres anticuerpos monoclonales dirigidos frente a IL-17: **secukinumab (SEC)** e **ixekizumab**, que bloquean IL-17A; y **brodalumab**, que está dirigido contra el receptor A de IL-17^{16,179,184} (Tabla 3).

Tabla 3. Fármacos biológicos inhibidores de IL-17.

Nombre	Tipo	Mecanismo	Vía de administración
Secukinumab (2015)	Anticuerpo IgG1κ monoclonal completamente humano recombinante contra IL-17A.	Neutraliza la actividad del homodímero de IL-17A al unirse selectivamente a ella con gran especificidad y afinidad y antagoniza el heterodímero IL-17A/F.	Subcutánea.
Ixekizumab (2016)	Anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado dirigido contra IL-17A.	Neutraliza la actividad del homodímero de IL-17A al unirse selectivamente a ella con gran especificidad y afinidad y antagoniza el heterodímero IL-17A/F.	Subcutánea.
Brodalumab (2018)	Anticuerpo IgG2 monoclonal completamente humano recombinante contra IL-17RA.	Bloquea la actividad biológica de las citocinas IL-17A, IL-17F, heterodímero IL-17A/F, IL-17C e IL-17E (también conocida como IL-25), al unirse a la proteína IL-17RA que se expresa en la superficie celular y es componente necesario de los receptores que utilizan dichas citocinas.	Subcutánea.

Ig: inmunoglobulina; IL: interleucina; AcM: anticuerpo monoclonal; TNFR: receptor de TNF; IL-17RA: receptor de IL-17A.

Los biológicos dirigidos a IL-17 son de acción rápida, con efecto ya en la primera semana de tratamiento, y un perfil de seguridad satisfactorio¹⁹¹⁻¹⁹⁴. **Secukinumab** fue el primer inhibidor de IL-17A aprobado para la psoriasis en 2015, cuenta con una probabilidad significativa de alcanzar PASI 75 ya en la primera semana de tratamiento e incluso de mantener PASI 100 después de un año^{191,192}. **Secukinumab** e **ixekizumab** han demostrado su eficacia para la psoriasis del cuero cabelludo y las uñas, que son dos variantes clínicas resistentes a las

terapias tópicas convencionales. Los principales eventos adversos de este grupo fueron candidiasis, neutropenia, nasofaringitis, enfermedad inflamatoria intestinal, infección del tracto respiratorio superior y artralgia y depresión y riesgo de suicidio en el caso de **brodalumab**¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Las infecciones por *Candida* son más frecuentes en pacientes que reciben secukinumab e ixekizumab, en comparación con anti-TNF α , porque la señalización de IL-17 es fundamental para la defensa aguda contra infecciones fúngicas y bacterianas extracelulares¹⁹⁸. No obstante, no se trata de infecciones graves y no suelen justificar la interrupción del tratamiento. El hecho de que la respuesta con **secukinumab** se mantenga aun después de la cesión del fármaco sugiere que dirigirse a la señalización de IL-17 ejerce algún efecto modificador de la enfermedad que podría conseguir restablecer la homeostasis de la vía inflamatoria en algunos pacientes.

La citocina IL-23 es un dímero compuesto por las subunidades p40 y p19, siendo ambas claves para su inhibición. Además, p40 no es exclusivo de IL-23, sino que se comparte con IL-12, citocina implicada en la diferenciación de las células T vírgenes en Th1, por lo que los fármacos dirigidos frente a esa subunidad bloquearán tanto la activación de Th17 y Th22, como de Th1. Los inhibidores de IL-23 actualmente disponibles son: **ustekinumab (UST)** (inhibe conjuntamente IL-23 e IL-12), **guselkumab**, **tildrakizumab** y **risankizumab**^{16,179,184} (**Tabla 4**).

Tabla 4. Fármacos biológicos inhibidores de IL-12/23 o IL-23.

Nombre	Tipo	Mecanismo	Vía de administración
Ustekinumab (2009)	Anticuerpo IgG1κ monoclonal completamente humano recombinante contra la subunidad p40.	Inhibe la bioactividad de la IL-12 y la IL-23 humanas al impedir la unión de p40 a la proteína receptora IL-12Rβ1, expresada en la superficie de las células inmunitarias.	Subcutánea.
Guselkumab (2017)	Anticuerpo IgG1λ monoclonal completamente humano dirigido contra la subunidad p19.	Neutraliza la actividad de IL-23 al unirse selectivamente a ella con gran especificidad y afinidad.	Subcutánea.
Tildrakizumab (2018)	Anticuerpo IgG1/κ monoclonal humanizado dirigido contra la subunidad p19.		Subcutánea.
Risankizumab (2019)	Anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado dirigido contra la subunidad p19.		Subcutánea.

AcM: anticuerpo monoclonal; Ig: inmunoglobulina; IL: interleucina; IL-12Rβ1: receptor de IL-12 beta 1.

Ustekinumab fue el primer biológico aprobado para la psoriasis después de los inhibidores de TNF-α. En los estudios comparativos con los anti-TNFα se observó que la vida media de este es significativamente más prolongada. La eficacia clínica de **ustekinumab** mostró el papel crucial de la vía IL-23/Th17 y el beneficio adicional de inhibir también IL-12, e impulsó el desarrollo de fármacos dirigidos frente a IL-23, naciendo así **guselkumab**, **tildrakizumab** y **risankizumab** con especificidad por p19, todos ellos con gran eficacia clínica¹⁹⁹⁻²⁰². **Guselkumab** mostró superioridad clínica en comparación con adalimumab¹⁹⁹. Los principales efectos adversos de este grupo incluyen nasofaringitis, infección del tracto respiratorio superior, reacción en el punto de inyección, dolor de cabeza y cansancio. Los pacientes tratados con **risankizumab** fueron seguidos durante 48 semanas después de la última inyección en la semana 16, y una cuarta parte de ellos mostró un PASI 100 mantenido²⁰². Actualmente se está estudiando si la inhibición de IL-23 tiene el potencial de modificar el curso de la enfermedad, aunque el fármaco ya se haya eliminado, como sucede con los anti-IL17.

4.1.2.3. Biosimilares.

En los últimos años están llegando a su fin las patentes de muchos de los productos biológicos y están ingresando al mercado versiones biosimilares que empiezan a incorporarse al arsenal terapéutico de la psoriasis y a otorgar mayor accesibilidad de los pacientes a los biológicos. Actualmente hay ocho biosimilares de adalimumab, cuatro biosimilares de infliximab y dos biosimilares de etanercept aprobados en Europa¹⁶.

4.1.3. Esquema terapéutico actual de la terapia sistémica en psoriasis moderada-severa.

Aproximadamente un 20% de los casos de psoriasis son considerados de grado moderada-severa¹², lo cual quiere decir que un alto porcentaje de los pacientes requerirá una terapia sistémica. El panel de expertos del Grupo Español de Psoriasis de la Academia Española de Dermatología y Venereología (AEDV) alcanzó un acuerdo sobre las indicaciones del tratamiento sistémico en el manejo de la psoriasis moderada a severa, siendo los criterios para comenzar el tratamiento sistémico cualquiera de los siguientes puntos¹⁸²:

- PASI superior a 10.
- Formas extensas de psoriasis (BSA > 5 - 10 %, la *National Psoriasis Foundation* recomienda BSA > 3 %).
- Psoriasis que no se controla con medicación tópica.
- Psoriasis moderada a severa en pacientes no aptos para fototerapia.
- Recaídas rápidas (menos de 3 meses después de retirar el tratamiento).
- Limitaciones funcionales (palmoplantar, genital).
- Compromiso de áreas visibles (cara).
- Percepción subjetiva de gravedad (DLQI > 10).
- Psoriasis eritrodérmica o psoriasis de tipo pustulosa extensa.

Para la elección de uno u otro tratamiento sistémico, deben tenerse en cuenta las características de la enfermedad (gravedad y ubicación de las lesiones), del paciente (edad, historial de tratamiento, comorbilidades) y de los propios fármacos disponibles. La guía clínica de 2020 propuesta por el grupo *EuroGuiDerm*¹⁰ sugiere un esquema de tratamiento base (**Figura 9**) para que los distintos países lo adapten acorde a sus propias recomendaciones, regulaciones locales y disponibilidad de cada grupo de fármacos.

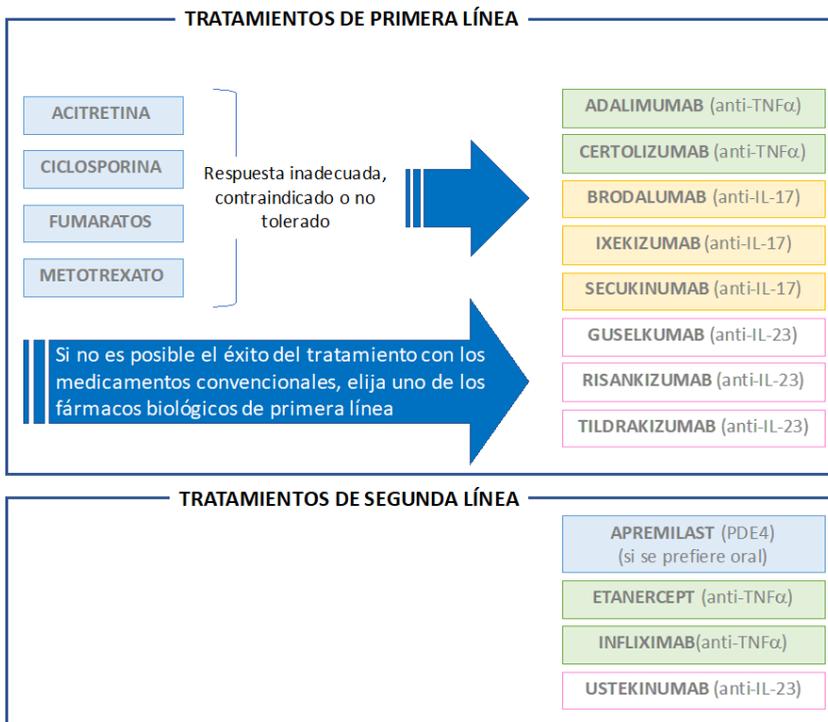


Figura 9. Esquema terapéutico para la psoriasis en placa moderada-severa según las indicaciones aprobadas por la Agencia Médica Europea (esquema adaptado de Nast, 2020)¹⁰. PDE4: inhibidor de la fosfodiesterasa 4.

Esta guía está basada en los datos sobre seguridad y eficacia, pero además tiene en cuenta el tiempo que un tratamiento ha estado disponible, ya que la información sobre efectos secundarios raros y datos de seguridad a largo plazo generalmente se vuelve más sólida con el

tiempo, y el número de pacientes tratados con el fármaco a lo largo del tiempo ("pacientes-años")¹⁰. Es por ello que los tratamientos considerados tradicionales encabezan la lista. Además, MTX es una de las terapias sistémicas más accesibles en términos de coste.

El último metaanálisis disponible en la base de datos Cochrane mostró que los anti-IL17, seguidos de anti-IL23, anti-IL12/23 y anti-TNF α superaron a las moléculas pequeñas y a los agentes sistémicos convencionales en efectividad a la hora de alcanzar PASI 90¹⁸¹, además de haber demostrado ampliamente mayor tolerabilidad y menos efectos secundarios que los tratamientos convencionales^{181,203}. Sin embargo, y a pesar de que estos datos se están confirmando con el paso del tiempo y el número de pacientes tratados al año, el principal inconveniente del uso de la terapia biológica en la práctica clínica sigue siendo su elevado coste^{10,156,182}. De hecho, los tratamientos biológicos suelen ser posicionados como terapias de segunda o tercera línea por los organismos reguladores¹⁸¹. A apremilast se le aplican restricciones similares a los biológicos por la falta de conocimientos de seguridad a largo plazo, pero también por consideraciones económicas, aunque parece ser más eficaz que los inmunosupresores convencionales¹⁸¹.

Debido a sus costes y a la existencia de la terapia convencional, los pacientes deben reunir criterios obligatorios antes de ser considerados para estos tratamientos¹⁰. Así lo acordó también el panel de expertos del Grupo Español de Psoriasis de la AEDV, considerando que, aunque la toxicidad de la terapia sistémica clásica es mayor que la de las terapias biológicas, el coste y la eficiencia son importantes a la hora de indicar un tratamiento sistémico. Los criterios que se consideran para decidirse por el tratamiento con medicamentos biológicos son cualquiera de los siguientes puntos¹⁸²:

- Pacientes en los que no se consigue un control eficaz de la enfermedad con los medicamentos sistémicos disponibles, solos o en politerapia.
- Pacientes que experimentan una rápida recidiva (en el plazo de 3 meses) tras suspender el tratamiento.
- Pacientes que necesitan dosis altas del tratamiento sistémico convencional (con riesgo de efectos adversos debido a su toxicidad).
- Pacientes que no toleran el tratamiento sistémico o que tienen un alto riesgo de toxicidad con MTX, ciclosporina, acitretina o fototerapia, incluso en ausencia de anomalías analíticas.
- Pacientes con comorbilidades para las cuales están contraindicados el MTX o la ciclosporina.

La mayoría de las guías clínicas no recomiendan ningún agente biológico concreto, sino que abogan por individualizar cada caso, teniendo en cuenta factores del paciente (edad, riesgo de efectos adversos, peso y la presencia de comorbilidades), su historial de tratamiento (tratamientos previos, recaída rápida después del tratamiento, actividad de la enfermedad intermitente o continua), las características de la enfermedad (gravedad e inestabilidad), la posibilidad de adherencia a la terapia y la ruta de administración, y por supuesto, las características de cada biológico, con la tasa de eficacia (PASI 75 o PASI 90) y el mantenimiento de la respuesta como parámetros a considerar^{182,204,205}. La presencia de psoriasis inestable es determinante en la elección del tratamiento de acción rápida y el paciente calificado debe participar en la elección del tratamiento¹⁸². El Grupo Español de Psoriasis propone que en el caso de una falta o pérdida de respuesta a un agente anti-TNF α , las opciones incluyen cambiar a otro agente anti-TNF o ustekinumab, aunque no hay un acuerdo en que la opción recomendada

debería ser cambiar a ustekinumab¹⁸². Cuando el motivo del cambio es un evento adverso de efecto de clase, la opción recomendada es cambiar a una clase de fármaco diferente¹⁸² y están de acuerdo en que los biológicos deben ser prescritos por dermatólogos con experiencia en el manejo de la psoriasis con agentes sistémicos clásicos y agentes biológicos¹⁸².

La cuestión de si los productos biológicos deben considerarse una terapia de primera línea sigue siendo tema de debate entre los propios expertos en el área¹⁸². En la mayoría de los ensayos clínicos con agentes biológicos realizados como parte del proceso de aprobación del fármaco, el único criterio de inclusión utilizado fue la presencia de psoriasis en placas de moderada a grave (PASI \geq 10-12), pero en la práctica diaria son más las circunstancias a tener en cuenta para la prescripción¹⁸². Si bien el coste y la eficiencia son factores importantes a considerar a la hora de indicar un tratamiento con biológicos, debería considerarse secundario a criterios clínicos relevantes para la salud del paciente.

4.2. Repercusión del tratamiento sistémico sobre la comorbilidad cardiovascular.

La hipótesis de que la cascada inflamatoria activada en psoriasis contribuye al proceso aterosclerótico ha sentado las bases para suponer que la terapia antiinflamatoria podría, teóricamente, mejorar también la aterosclerosis y reducir el riesgo de MACEs. Conocer el nivel de afectación sistémica del paciente sería clave para la elección de un tratamiento óptimo capaz de controlar los mecanismos subyacentes que promueven la aparición de comorbilidades que acaban convirtiéndose en complicaciones importantes de la enfermedad. Igual que la fototerapia y los tratamientos tópicos mejoran los síntomas cutáneos localizados, pero apenas afectan a las causas subyacentes de la enfermedad²⁰⁶, dentro del arsenal de tratamientos sistémicos pueden existir diferencias en el grado

de actuación sobre la inflamación generalizada. Averiguar la repercusión cardiovascular de las distintas terapias permitiría la optimización del esquema terapéutico de la psoriasis moderada-grave.

Ha sido con la introducción de las terapias biológicas que han aumentado notablemente las expectativas del control sobre la comorbilidad cardiovascular, más que con los tratamientos convencionales⁷⁴. Los datos de estudios retrospectivos apoyan que ciertos agentes sistémicos, especialmente MTX y los biológicos, pueden tener un efecto cardioprotector reduciendo la probabilidad de que los pacientes con psoriasis desarrollen una ECV^{34,56,207-210}, aunque actualmente no está claro si alguna de estas terapias podría alterar el riesgo de desarrollo de ECV.

La **hipótesis de trabajo** que motiva la presente tesis doctoral es que los fármacos antiinflamatorios biológicos incluidos en el esquema terapéutico de la psoriasis podrían tener la capacidad de mejorar la función vascular, de forma independiente o no a su efecto sobre la clínica cutánea, y reducir el riesgo cardiovascular en los pacientes con psoriasis moderada-severa, lo que unido a su ventajoso perfil de seguridad con respecto a las terapias convencionales, aumentaría su potencial terapéutico y podría ser una razón de peso para replantear la posición de estos fármacos en el algoritmo general de tratamiento de la psoriasis de moderada a grave.



Objetivos

El **objetivo general** de esta tesis es doble: (1) evaluar el impacto de la psoriasis en la disfunción vascular y (2) comparar la capacidad de distintos fármacos sistémicos utilizados en el tratamiento de la psoriasis moderada-grave (fármacos anti-TNF α , anti-IL17, anti-IL12/23 y metotrexato) de mejorar la inflamación vascular.

Para ello, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. En un modelo murino de psoriasis:
 - 1.1. Valorar el potencial de la psoriasis como factor de riesgo cardiovascular independiente, comprobando su asociación con la existencia de disfunción vascular, medida como interacción leucocito-endotelio.
 - 1.2. Determinar el incremento del riesgo protrombótico causado por la presencia de la enfermedad.
 - 1.3. Evaluar el impacto *in vivo* de los fármacos biológicos (adalimumab, etanercept, infliximab, secukinumab y ustekinumab) y de la terapia convencional (metotrexato) sobre los parámetros de disfunción vascular (interacción leucocito-endotelio) y el riesgo protrombótico asociado a la psoriasis inducida.
2. En muestras de pacientes con psoriasis moderada-grave:
 - 2.1. Analizar la existencia de disfunción vascular en pacientes que aún no reciben tratamiento sistémico, mediante el estudio de moléculas de adhesión leucocitarias y parámetros de interacción leucocito-endotelio.
 - 2.2. Evaluar el impacto de los diferentes fármacos biológicos (anti-TNF α , anti-IL17A y anti-IL12/23) y del tratamiento sistémico clásico (metotrexato) sobre la inflamación vascular

OBJETIVOS

- (i) en pacientes con psoriasis en fase de remisión por tratamiento con uno de los fármacos mencionados, así como
 - (ii) en pacientes naïve con psoriasis activa que comienzan tratamiento con terapia biológica, observando en estos la progresión en el tiempo de la interacción leucocito-endotelio y de la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias.
- 2.3. Investigar la repercusión de los complejos plaqueta-leucocito en la psoriasis como potencial nexa con el desarrollo de eventos cardiovasculares.



Material y métodos

1. MATERIAL.

1.1. Fármacos empleados.

Los medicamentos biológicos empleados en esta tesis fueron adquiridos en colaboración con el Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia (España). Adalimumab (Humira®), etanercept (Enbrel®), secukinumab (Cosentyx®) y ustekinumab (Stelara®), con formato de solución inyectable en jeringas o plumas precargadas, se diluyeron en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) para los experimentos *in vivo*. Infliximab (Remicade®), en formato polvo para su administración por perfusión, se disolvió a temperatura ambiente, sin dificultad, en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) para los experimentos *in vivo*. Las diferentes concentraciones de cada fármaco se realizaron de mayor a menor de forma seriada, siguiendo el mismo procedimiento para cada uno de ellos. Metotrexato (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) en formato polvo, se disolvió en solución de carbonatos (pH 9,4) y sus posteriores diluciones se hicieron con solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) para los experimentos *in vivo*. No se encontró un impacto significativo en ninguno de los parámetros analizados con las concentraciones empleadas de los vehículos. Para los experimentos previos *in vitro* (resultados no mostrados), necesarios para la puesta a punto de los protocolos experimentales, se sustituyó la solución salina por agua estéril.

1.2. Reactivos.

La mayoría de reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Stenheim, Alemania), Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España), Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), Lonza (Basel, Suiza) y Beckton Dickinson (Allschwil, Suiza) (**Tablas 5 y 6**).

Tabla 5. Reactivos utilizados.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Adenosín difosfato (ADP)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Albúmina Sérica Humana (HSA) (25%)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Azul de tripano	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Cloruro férrico	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Colagenasa	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Crema Imiquimod 5% (Aldara)	3M Pharmaceuticals, 3M Health Care family, Minnesota, Estados Unidos
Cubre de plástico de 25 mm de diámetro	Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Dextrano	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
DPX, medio de montaje	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Dulbecco's PBS con Ca ²⁺ y Mg ²⁺ (DPBS+)	Lonza, Basilea, Suiza
Dulbecco's PBS sin Ca ²⁺ y Mg ²⁺ (DPBS-)	Lonza, Basilea, Suiza
EBM-2 medio de cultivo + kit suplementos	Lonza, Basilea, Suiza
ELISA dímero D humano (kit)	Abyntek Biopharma S.L., Vizcaya, España
ELISA dímero D ratón (kit)	Abyntek Biopharma S.L., Vizcaya, España
Eosina	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Etanol	J.T. Baker™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos

Fibronectina	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, Chicago, Estados Unidos
Formalina 10%	Histofix® Preservative, PanReac
HBSS	Lonza, Basilea, Suiza
HCl	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
Hematoxilina	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Hidróxido Amónico	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Ketamina	Merial, Lyon, Francia
MgSO ₄	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
NaHCO ₃	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
PBS	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Penicilina/streptomycin/ anfotericina	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
RPMI 1640 suplementado con 20 mM HEPES	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Solución de Lisis	BD Biosciences, Beckton Dickinson
Suero Fetal Bovino	Lonza, Basilea, Suiza
Suero Fisiológico (NaCl 0.9%)	B. Braun, Melsungen, Alemania
Tripsina	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Tubos citrato sódico	BD Vacutainer, Beckton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos
Xilacina	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Xileno	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España

Tabla 6. Anticuerpos frente a humano utilizados.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL
Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo Control FITC	BD Pharmingen, BDBiosciences, Beckton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos
Anticuerpo frente a CD18 FITC	
Anticuerpo frente a CD11a FITC	
Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo Control PE	
Anticuerpo frente a CD11b PE	
Anticuerpo frente a CD11c PE	
Anticuerpo frente a CD49d PE	
Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo	Beckman Coulter SLU, Barcelona, España
Anticuerpo frente a CD41 PE	

2. ESTUDIOS *IN VIVO* EMPLEANDO UN MODELO MURINO.

2.1. Animales de experimentación.

Se emplearon ratones *wild-type* C57BL/6 machos de 9 semanas de edad (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). Una vez recibidos, se estabularon bajo condiciones estandarizadas (22 ± 3 °C, fotoperiodo de 12/12 horas de luz/oscuridad, alimentación artificial estándar y agua *ad libitum*). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia, siguiendo la normativa del Real Decreto 53/2013 (código de referencia: A1487302585981).

2.2. Modelo murino de psoriasis inducida por imiquimod.

Para la inducción de la psoriasis se siguió el protocolo descrito por van der Fits *et al.* (2009)²¹¹, basado en el uso de imiquimod (IMQ), una sustancia agonista de receptores de tipo Toll 7 y 8 (TLR7-8, del inglés *Toll Like Receptor*) del sistema inmunitario innato que, al activarlos, induce la síntesis de mediadores proinflamatorios desencadenando una respuesta similar a la que tiene lugar en psoriasis, tanto morfológica (eritema,

descamación, engrosamiento de la piel, acantosis, paraqueratosis e infiltración dérmica de células T) como mecánicamente (activación de citocinas del eje IL-17/IL-23)²¹¹.

Un día antes de iniciar el protocolo, se rasuró un área de aproximadamente 3 x 2 cm en la espalda de los ratones con una maquinilla eléctrica. Los ratones se trataron tópicamente con una dosis diaria de 62,5 mg de una crema de imiquimod 5% (Aldara™; 3M Pharmaceuticals) (3,125 mg de IMQ) en la espalda afeitada y en la oreja derecha (a modo de control positivo con respecto a la oreja izquierda) durante 2, 4 o 6 días (modelo completo) (**Figura 10**). Los ratones vehículo se trataron de forma similar con vaselina, sin IMQ. Para complementar la pérdida de líquidos asociada al tratamiento con IMQ²¹², se les inyectó 100 µL de solución salina vía intraperitoneal (i.p.) a todos los ratones (incluidos los del grupo vehículo) los días 2 y 4 (**Figura 10**). El peso corporal se midió antes de la inducción de la psoriasis y todos los días hasta el sacrificio.

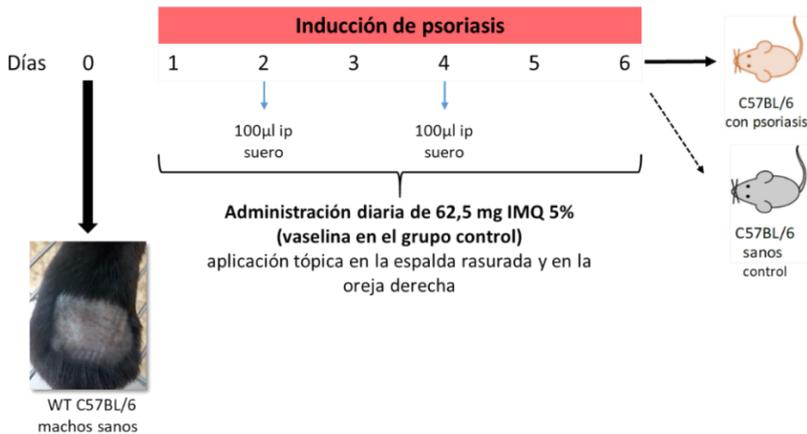


Figura 10. Modelo murino de psoriasis inducida por imiquimod. Distinguimos entre ratones con psoriasis (administración tópica diaria de IMQ), y ratones sin psoriasis (administración tópica diaria de vaselina). IMQ: imiquimod; i.p.: intraperitoneal; WT: *Wild Type*.

El día posterior a la última aplicación de la crema (día 7 en los grupos sometidos al modelo completo) se llevó a cabo la cirugía de exposición del cremáster para la evaluación de la inflamación y trombosis vascular mediante microscopía intravital (apartado 2.3.).

2.3. Microscopía intravital.

Los ratones (22 - 30 g) con psoriasis inducida o sin ella (grupo vehículo) se anestesiaron con una mezcla de xilacina clorhidrato 10 mg/kg y ketamina clorhidrato 200 mg/kg vía i.p. A continuación, se llevó a cabo la cirugía de exposición del músculo cremáster, el cual se extiende sobre un pedestal transparente (**Figura 11**) que permite su transiluminación, directamente *in vivo*, a través de un microscopio ortostático (Nikon Eclipse E600FN, Nikon Instruments Inc, Países Bajos) con una cámara de video incorporada (Nikon DS-Fi; Nikon Instruments Inc, Países Bajos) (**Figura 12**).



Figura 11. Cremáster expuesto sobre pedestal transparente. Empleado para el estudio de la interacción leucocito-endotelio y la formación del trombo (imagen obtenida de la Tesis Doctoral de Víctor Collado Díaz, 2018).

Una vez concluida la cirugía se seleccionaron vénulas (diámetro 30 - 40 μm) y arteriolas (diámetros 25 - 30 μm) del cremáster sin ramificaciones²¹³. Los diámetros se midieron con un calibrador de video (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, USA) (**Figura 12**). Durante todo el procedimiento, el tejido se superfundió continuamente con solución salina tamponada con bicarbonato (pH 7,4, 37 °C, 2 mL/min). Los vasos seleccionados se

grabaron digitalmente mediante el programa NIS Elements AR²¹⁴. Se utilizó un velocímetro Doppler óptico (Instituto de Investigación de Microcirculación, Estados Unidos) (**Figura 12**) para medir la velocidad de los glóbulos rojos en la línea central, con el fin de asegurar que los vasos elegidos poseen un flujo estable y comparable. Posteriormente, en los videos recopilados se evaluaron las interacciones leucocito-*endotelio* sobre las vénulas y la tendencia a la formación de trombo en las arteriolas.

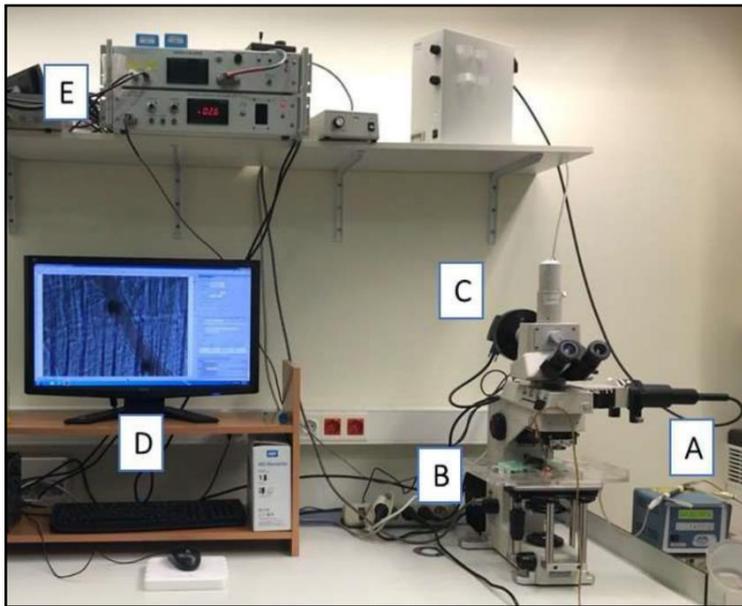


Figura 12. Montaje de microscopía intravital. (A) Baño termostático, **(B)** Pedestal translucido, **(C)** Videocámara, **(D)** Monitor de ordenador, **(E)** “Video Caliper” y “Optical Doppler Velocimeter”.

2.3.1. Evaluación intravital de interacciones leucocito-*endotelio*.

El uso de microscopía intravital en la bibliografía para evaluar las interacciones leucocito-*endotelio* ha sido fundamental para comprender la cascada inflamatoria asociada con las enfermedades vasculares y su modulación farmacológica²¹⁵. Esta técnica nos permitió evaluar los procesos de rodamiento y adhesión firme leucocitaria *in vivo*²¹⁶. Las vénulas seleccionadas en el proceso anterior se grabaron durante 5

minutos y, en esas imágenes, se evaluaron las interacciones leucocito-endotelio. El análisis fue ciego para los tratamientos administrados. Se evaluaron 2 parámetros leucocitarios, el número de leucocitos en fase de rodamiento y adherentes durante el análisis de reproducción de imágenes digitales:

- **Rodamiento leucocitario** (células/minuto): número de leucocitos que circulan a una velocidad inferior a los eritrocitos porque están en la primera fase de interacción con el endotelio. Se determina contabilizando el número de leucocitos que pueden ser visualizados en un punto de referencia preestablecido de la vénula durante 1 minuto.
- **Adhesión leucocitaria** (células/mm²): número de leucocitos que permanecen estacionados por un contacto estable con el endotelio venular durante un periodo igual o superior a 30 segundos en 100 μm de vaso.

2.3.2. Evaluación intravital de trombosis arterial: modelo de trombosis inducida por superfusión de cloruro férrico (FeCl₃).

Las arteriolas seleccionadas se utilizaron para evaluar la tendencia a la formación de trombo. La trombosis intraarteriola se indujo siguiendo el modelo de inducción de daño vascular por superfusión de cloruro férrico (FeCl₃) de Subramanian *et al.*²¹⁷ con ligeras modificaciones. Es uno de los modelos de trombosis murinos más utilizados y ampliamente descrito, engloba daño endotelial junto a activación plaquetaria y leucocitaria²¹⁸. El daño producido por el FeCl₃ sobre los vasos sanguíneos es un daño oxidativo por efecto físico-químico, sin mediación de citocinas proinflamatorias²¹⁹, que da lugar a disfunción endotelial, induciendo una trombosis oclusiva. El tiempo de oclusión depende de la concentración de FeCl₃ empleada: a concentraciones bajas (≤ 50 mM en nuestro modelo),

el FeCl_3 no es capaz de producir este daño, requiriendo de factores externos predisponentes para la formación del trombo, lo que nos indica la existencia o no de un entorno protrombótico. El tiempo requerido para la oclusión del vaso nos permite medir de forma cuantitativa el daño vascular.

Una vez localizada la arteria (diámetro 25 - 30 μm) individual sin ramificaciones con flujo sanguíneo estable, confirmado con el velocímetro Doppler, se detuvo la superfusión de solución salina tamponada con bicarbonato para evitar diluir la solución de FeCl_3 y se aplicaron 80 μL de solución de FeCl_3 50 mM sobre la arteria seleccionada y, 20 segundos después, se reinició la superfusión de solución salina tamponada con bicarbonato. La concentración de 50 mM empleada en nuestros experimentos fue seleccionada a partir de estudios preliminares dosis-respuesta para comprobar que no modifica el flujo sanguíneo por sí sola, pero predispone a las arteriolas a los efectos trombogénicos de otros agentes o afecciones con potenciales efectos vasculares deletéreos que, de otro modo, permanecerían indetectables. Para asegurar que la solución de cloruro bañaba el vaso seleccionado, nos ayudamos de un láser incorporado al objetivo cuya proyección indicaba la localización de la arteria.

Una vez añadido el FeCl_3 se inició la grabación. Las imágenes se registraron hasta que cesó el flujo sanguíneo o durante 8 minutos como tiempo máximo si no se producía oclusión del vaso. El parámetro hemodinámico determinado fue:

- **Tiempo de oclusión (segundos):** tiempo transcurrido desde la adición de FeCl_3 hasta la formación del trombo, que concluye con la parada del flujo sanguíneo. Si tras 8 minutos (480 segundos) no se detenía el flujo, se considera que no se ha producido trombo.

2.4. Protocolo experimental *in vivo*: tratamiento farmacológico de ratones con psoriasis y evaluación de la interacción leucocito-endotelio y la formación de trombosis.

El protocolo completo consistió en la combinación del modelo de psoriasis inducida por IMQ (descrito en el apartado 2.2.), con la posterior evaluación por microscopía intravital y aplicación del modelo de trombosis inducida por superfusión de FeCl₃. El día posterior a la inducción completa de la psoriasis, los animales se anestesiaron y se llevó a cabo la técnica de microscopía intravital (descrita en el apartado 2.3.) (Figura 13), con la que se evaluó:

- el grado de interacción de los leucocitos con el endotelio (descrito en el apartado 2.3.1.)
- y la tendencia a la formación de trombos (protocolo en el apartado 2.3.2.).

Para evaluar si los fármacos biológicos incluidos en el estudio *in vivo* (Tabla 7) modificaban estos parámetros (interacción leucocito-endotelio y riesgo de trombosis), se administraron al grupo de animales correspondiente en una **dosis única, 24 horas** antes de que se iniciara el protocolo de inducción de trombosis.

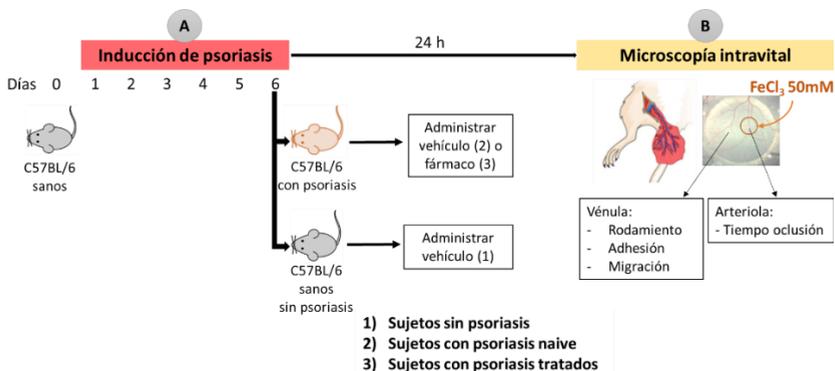


Figura 13. Protocolo experimental para la evaluación de la interacción leucocito-endotelio y riesgo de trombosis en ratones con psoriasis tratados con distintos fármacos biológicos. La microscopía intravital nos permite evaluar las interacciones leucocito-endotelio y, junto al modelo de trombosis, la existencia de un entorno protrombótico. Los grupos incluidos son: (1) ratones sin psoriasis:

administración i.p. de 100 μ L suero fisiológico 24 horas antes de la cirugía, (2) ratones con psoriasis *naïve*: psoriasis inducida por aplicación de IMQ y administración i.p. de 100 μ L suero fisiológico 24 horas antes de la cirugía, y (3) ratones con psoriasis tratados con uno de los agentes biológicos: psoriasis inducida y administración i.p. - o i.v. por la cola en el caso de INF - de 100 μ L del biológico 24 horas antes de la cirugía.

La dosificación fue equivalente en mg/ kg a la administrada en un contexto clínico (**Tabla 7**). En el caso de ADA, además se pudo ajustar la dosis en base a los datos obtenidos en estudios que evaluaban el grado de unión del este fármaco (que es un anticuerpo monoclonal frente a TNF α humano) al TNF α de ratón²²⁰.

Tabla 7. Dosis de los fármacos biológicos y vías de administración empleadas en el tratamiento de los ratones con psoriasis inducida.

Fármaco biológico	Rango de dosis empleada	Vía de administración
ADALIMUMAB	2,2 – 4,4 mg / kg	i.p.
INFLIXIMAB	5 – 10 mg/kg	i.v.
ETANERCEPT	0,7 – 1,4 mg/kg	i.p.
SECUKINUMAB	2,1 – 4,3 mg/kg	i.p.
USTEKINUMAB	0,7 – 1,3 mg/kg	i.p.

Vías de administración iguales a las empleadas en humanos y dosis equivalentes a los mg/kg aprobados para humanos. i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenosa.

En el caso del MTX (0,29 - 0,57 mg/kg, i.p.)²²¹, se probaron dos esquemas de tratamiento (**Figura 14**): (a) dosis única 24 h antes de la microscopía intravital y (b) dosis repetidas a diario desde el inicio de la inducción de la psoriasis. En el caso (b) omitimos la hidratación con suero, ya que con cada administración de MTX el vehículo actuaba como hidratación. El peso corporal se midió antes de la inducción de la psoriasis y todos los días hasta el sacrificio.

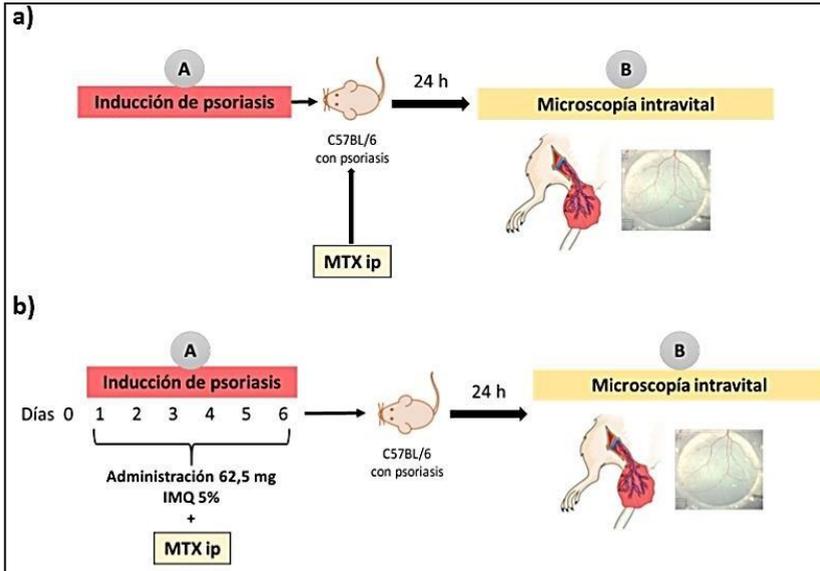


Figura 14. Protocolo experimental de tratamiento con metotrexato. a) Dosis única 24 horas antes de la cirugía. **b)** Dosis repetidas durante la inducción de la psoriasis. h: horas; IMQ: imiquimod; i.p.: intraperitoneal; MTX: metotrexato.

Tras 24 horas de tratamiento, los animales se sometieron a la cirugía de exposición del músculo cremáster, para el posterior análisis intravital (**Figura 15**).

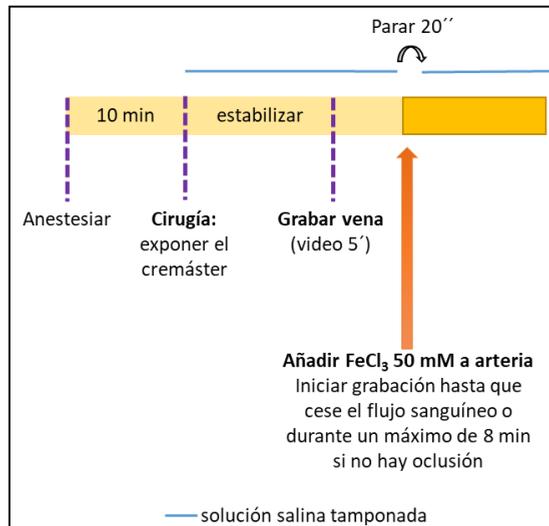


Figura 15. Procesos llevados a cabo 24 horas después de la administración de los fármacos. En venas evaluamos las interacciones leucocito-endotelio y en las arterias la predisposición protrombótica.

2.5. Recolección de tejidos.

Al terminar la microscopia intravital, se recolectó sangre del animal (aproximadamente 500 μ L) por punción cardíaca en tubos sin anticoagulante y se centrifugó 30 minutos a 16000 x g para la obtención de suero. Se almacenaron en tubos la piel dorsal afecta, las orejas y el bazo. Todo ello se conservó a -80 °C hasta su uso.

2.6. Tinción hematoxilina-eosina de la piel afecta.

La piel dorsal afecta almacenada a -80 °C se descongeló a temperatura ambiente y se fijaron en solución de formalina 10% (Histofix® Preservative, PanReac) a 4 °C previamente a su paso por el microtomo (Leica RM2245; Leica Biosystems. Barcelona, España). Se incluyó en parafina y se seccionó en cortes transversales que permitieran visualizar la epidermis y la dermis, incluyendo 3 cortes por cada portaobjetos de cristal. La parafina fue eliminada sumergiendo los portaobjetos de cristal en xileno (5 min, 2 veces sucesivas) y los cortes rehidratados en cubetas con una cadena de disoluciones de etanol en concentración decreciente, 3 minutos en cada una de las concentraciones, y lavados con agua destilada y agua corriente para quitar el exceso de alcohol. Añadimos hematoxilina (Hematoxylin solution, Gill No. 3; Sigma), diluida 1/3 (en agua) y filtrada, durante 50 segundos a temperatura ambiente, y lavamos con agua corriente. Seguidamente, se adicionaron unas gotas de etanol-HCl 0,5% sobre los portaobjetos y a los 10 segundos se lava con agua. Se adicionan unas gotas de hidróxido amónico 1% y se lava de nuevo. Se añade la eosina (Sigma-Aldrich) durante 1,5 minutos, y se lava rápidamente con agua. Finalmente, se rehidratan los cortes con una cadena de disoluciones de etanol en concentraciones crecientes, se aclara con xileno y se monta la preparación con un cubreobjetos de cristal en medio de montaje (DPX®, Sigma). Posteriormente se analizó el espesor dérmico en estos cortes histológicos

de piel. Las imágenes se adquirieron con un microscopio óptico digital (Leica DMD108; Leica Microsystems, Barcelona, España).

2.6.1. Análisis del espesor dérmico.

El análisis del grosor de la epidermis se llevó a cabo con el software Leica DMD108 del microscopio óptico digital (Leica DMD108; Leica Microsystems, Barcelona, España). Se tomaron 3 cortes histológicos por cada ratón, y de cada uno de ellos se hicieron 5 mediciones de la epidermis en zonas aleatorias, sumando un total de 15 mediciones por cada ratón. El proceso fue llevado a cabo por un observador ciego para el grupo experimental al que pertenecía cada ratón. El resultado del grosor de la epidermis fue el resultado de la media de las 15 medidas y se expresó en micrómetros (μm).

2.7. Medida de la masa esplénica.

Los bazo fueron conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Su masa se determinó en una balanza de precisión y se relativizó al peso total del correspondiente ratón. Para su conservación durante el proceso se trasladaron en un recipiente con hielo seco.

2.8. Medida del dímero D en suero de ratón.

La sangre recolectada en tubos sin anticoagulante, obtenida por punción cardíaca, se centrifugó 30 minutos a $16000 \times g$ para la obtención de suero, el cual fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para la determinación de la concentración de dímero D se utilizó el kit de ELISA *Mouse D-Dimer D2D* (Abyntek Biopharma S.L.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3. ESTUDIOS PRECLÍNICOS CON MUESTRAS HUMANAS DE PACIENTES CON PSORIASIS

3.1. Selección de la población de estudio.

La sangre periférica incluida en el estudio proviene de un total de 125 voluntarios, entre los cuales se incluye una muestra de 91 participantes con psoriasis y 32 voluntarios sanos con rango de edad y proporción de sexo equiparados. Dentro del grupo de participantes con psoriasis encontramos 3 cohortes diferenciadas:

- Sin tratamiento sistémico (*naïve*) con PASI \geq 10: 21 pacientes.
- En tratamiento continuado con un fármaco biológico (remisión clínica): 18 con ADA, 26 con SEC, 14 con UST.
- y en tratamiento con MTX: 12 pacientes.

Los grupos que reciben tratamiento siguen un régimen de monoterapia con el fármaco correspondiente. Ninguno de los pacientes considerados *naïve* había recibido terapia sistémica durante al menos los 4 meses previos a la inclusión en este estudio. Los requisitos de inclusión fueron la mayoría de edad (\geq 18 años) y estar diagnosticado con psoriasis moderada-severa (PASI y/o BSA \geq 10 y DLQI \geq 10). El diagnóstico de psoriasis fue valorado y confirmado por un dermatólogo. Los pacientes con historia de cardiopatía y/o que tenían pautados antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) fueron excluidos. Todos los que estaban en tratamiento con un biológico o con MTX debían estar en igualdad de condiciones en cuanto al control de la enfermedad, esto es, en remisión clínica (PASI $<$ 3).

La sangre de los individuos sanos se obtuvo del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana o del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se reclutó a los voluntarios sanos correspondientes para someterse a las mismas pruebas que los pacientes

seguimiento para la obtención de una segunda muestra con el fin de analizar los cambios a nivel de interacción leucocito-endotelio, que tuvieran lugar tras la instauración del tratamiento. No existe un consenso acerca del mejor momento para evaluar la respuesta inicial al tratamiento sistémico, pero en general, lo más aceptado, son 16 semanas, con excepciones en función del medicamento^{182,222,223}. Por esta razón, y por motivos prácticos de intervalos de tiempo entre las citas a la consulta de estos pacientes, el tiempo medio de tratamiento hasta la obtención de la segunda muestra sanguínea fue de unas 18 semanas de tratamiento. Se completó el seguimiento de 9 pacientes.

3.2. Recolección de las muestras de sangre periférica.

La sangre, tanto de individuos sanos como con psoriasis, se recogió en tubos con citrato sódico como anticoagulante (3 tubos de 4 mL por sujeto, aproximadamente 12 mL en total) (BD Vacutainer, Beckton Dickinson S.A., Madrid, España). A los pacientes *naïve* a los que se pudo realizar un seguimiento, se les recolectó una segunda muestra en las mismas condiciones, tras una media de 18 semanas después de la primera extracción.

3.3. Estudio de interacción leucocito-endotelio en cámara paralela de flujo.

El objetivo de la cámara paralela de flujo (*Flow Chamber*) es simular el flujo de un vaso, mediante la exposición de una monocapa de células endoteliales al flujo constante y homogéneo de una solución de leucocitos aislados. Mediante esta técnica podemos estudiar *in vitro* las interacciones leucocito-endotelio. Esta técnica requiere 3 pasos:

- a) Aislamiento y cultivo de células endoteliales.
- b) Aislamiento de leucocitos.
- c) Ensayo de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo.

3.3.1. Aislamiento y cultivo de células endoteliales.

Las células endoteliales se aislaron de vena de cordón umbilical humano (HUVEC, del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Se utilizaron cordones umbilicales frescos procedentes de donantes del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Las células se obtuvieron por el método de la colagenasa. Los vasos sanguíneos del cordón se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate-Buffered Saline*) a 37 °C y a continuación se les introdujo una solución de colagenasa (1 mg/mL) (**Figura 16**) con la que se les mantuvo en el incubador durante 17 min a 37 °C. Transcurrido el periodo de incubación, se masajearon suavemente para garantizar la separación de las células endoteliales de la pared del vaso, y el contenido se recolectó y centrifugó a 258 × g. El precipitado obtenido se resuspendió en medio endotelial basal 2 (EBM-2, del inglés *Endothelial Cell Basal Medium-2*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (2% v/v), hidrocortisona (0,04% v/v), factor básico de crecimiento de fibroblastos humano (hFGF-B) (0,4% v/v), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (0,1% v/v), factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 con arginina larga 3 recombinante (R3-IGF-1) (0,1% v/v), ácido ascórbico (0,1% v/v), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF) (0,1% v/v), gentamicina sulfato y anfotericina B (GA-1000) (0,1% v/v), heparina (0,1% v/v), penicilina (50 U/mL), estreptomycin (50 µg/mL) y fungizona (2,5 µg/mL); y se depositó en un frasco de cultivo T25. Las células se mantienen en el incubador de cultivo celular a 37 °C, en atmósfera de 95% de humedad relativa y 5% CO₂. En todos nuestros experimentos con HUVECs se utilizaron células del primer pase de los cultivos primarios.



Figura 16. Cordón umbilical humano saturado con solución de colagenasa para la extracción de células endoteliales. (Ilustración obtenida de la Tesis Doctoral de Samuel Orden, 2016).

3.3.2. Aislamiento de leucocitos.

Los leucocitos se aislaron de la sangre recolectada previamente (apartado 3.2.) de individuos sanos y pacientes con psoriasis, mediante generación de gradiente de densidad con el uso de dextrano y Ficoll-Paque® Plus.

En primer lugar, se adicionó dextrano 3% (en suero fisiológico) a la sangre entera en proporción 2:1 (unos 20 mL de dextrano sobre 10 mL de sangre), dejándolo incubar durante 45 min a temperatura ambiente, consiguiendo que se depositen gran parte de los eritrocitos en la parte inferior y el dextrano junto al resto de grupos celulares sanguíneos en la parte superior (**Figura 17 A**). A continuación, se recogió la fase superior y se depositó lentamente, para evitar su mezclado, sobre medio Ficoll-Paque Plus y se centrifugó a $258 \times g$ durante 25 minutos para permitir la separación leucocitaria por la diferencia de densidades. Tras la centrifugación, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) quedan en la interfase formando un anillo blanquecino y los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en el precipitado (**Figura 17 B**).

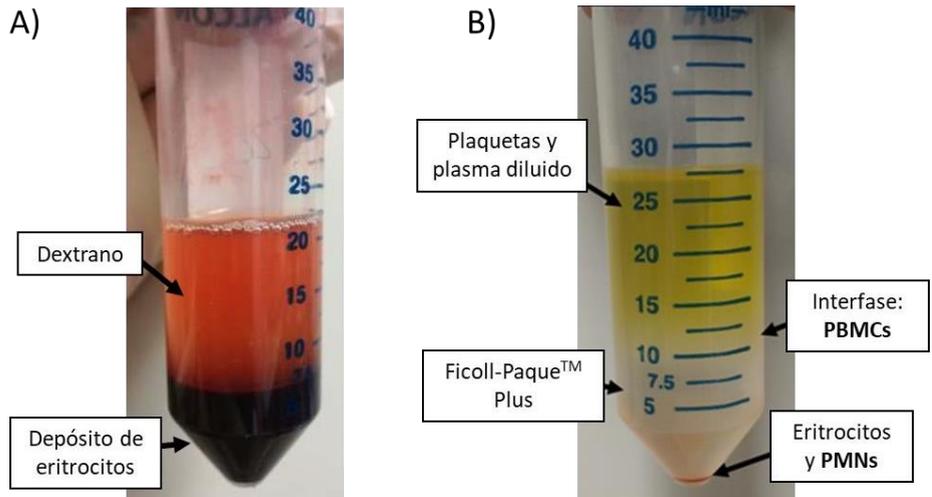


Figura 17. Aislamiento de leucocitos con dextrano-ficoll. **A)** Depósito de eritrocitos tras incubación a temperatura ambiente con dextrano. **B)** Separación de fases por gradiente de densidad en medio Ficoll-Paque Plus™. PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; PMNs: polimorfonucleares.

Para aislar los PBMC, se recolectó el anillo blanquecino (**Figura 17 B**) y se centrifugó de nuevo a $583 \times g$ durante 10 minutos. El sedimento de PBMCs obtenido se lavó con solución de Hanks equilibrada (HBSS, del inglés *Hanks Balanced Salt Solution*), sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , y se resuspendieron en medio RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*) completo (suplementado con suero fetal bovino inactivado (10% v/v), penicilina/estreptomicina (1% v/v), glutamina (1% v/v) y piruvato sódico (1% v/v). En el caso de los PMNs, el precipitado obtenido se lisó y se centrifugó de nuevo a $258 \times g$ durante 5 minutos, con el fin de eliminar los eritrocitos restantes. El sedimento de PMNs obtenido se lavó con HBSS, sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , y también se resuspendieron en medio RPMI completo. El breve periodo de tiempo entre su extracción y su paso por la cámara de adhesión (apartado 2.3.3.) se conservaron a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3. Adhesión dinámica en cámara paralela de flujo.

Esta técnica ha sido descrita previamente en de Pablo *et al.* (2012)²²⁴. Para este ensayo, el cultivo primario de HUVEC, al alcanzar la confluencia, se lavó con PBS, se despegaron las células con tripsina, y se sembraron en cubreobjetos circulares de plástico de 25 mm de diámetro pretratados con Fibronectina (5 µg/mL). La cámara de flujo utilizada para la realización de estos experimentos posee una hendidura (**Figura 18 A**) en la que se inserta el cubreobjetos circular que contiene la monocapa de células endoteliales confluentes y un canal por el que hacer pasar el flujo de leucocitos (PMNs o PBMCs) (**Figura 18 B**). Una vez montada la cámara, una porción de 5 x 25 mm de la monocapa de células endoteliales adheridas al cubreobjetos queda expuesta al flujo (**Figura 18 B**). Ambas poblaciones leucocitarias (PMNs o PBMCs) se centrifugaron 6 minutos a 258 × g y 8 minutos a 583 × g, respectivamente, y se resuspendieron en una proporción 1:1 de solución salina tamponada de Dulbecco con Ca²⁺ y Mg²⁺ (DPBS+, del inglés *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) y solución salina tamponada de Dulbecco sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (DPBS-), más albúmina sérica humana (HSA, del inglés *Human Serum Albumin*) (0,1%). De estas suspensiones de células se perfundieron 1 x 10⁶ células/mL de PMNs o de PBMCs sobre la monocapa de células endoteliales, a un flujo controlado de 0,36 mL/min (0,7 dinas/cm²) gracias a una bomba de infusión. El flujo leucocitario accederá al canal de la cámara a través de una conexión de entrada (**Figura 19 A**), atravesará el canal en el que los leucocitos entrarán en contacto con la superficie de 5 x 25 mm de la monocapa de células endoteliales y saldrá por la conexión de salida (**Figura 19 B**). Una tercera conexión en la parte anterior de la cámara permite la expulsión de posibles burbujas de aire del recorrido (**Figura 19 C**).

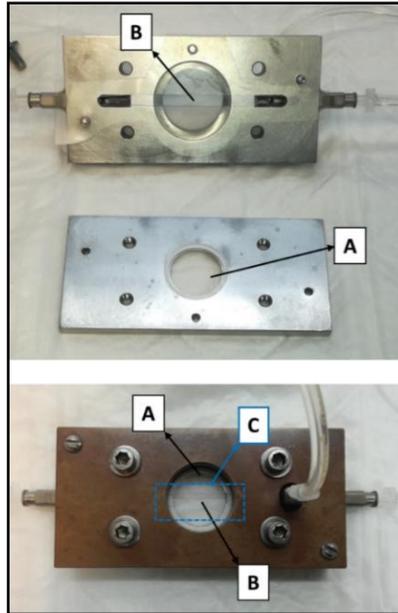


Figura 18. Cámara paralela de flujo. Abierta (arriba), cerrada (abajo). La cámara posee una hendidura (A) en la que se inserta el cubreobjetos circular que contiene la monocapa de células endoteliales confluentes y un canal (B) por el que pasarán los leucocitos, PMNs o PBMCs. Una vez montada la cámara, una porción de 5 x 25 mm (C) de la monocapa de células endoteliales adheridas al cubreobjetos queda expuesta al flujo de leucocitos.

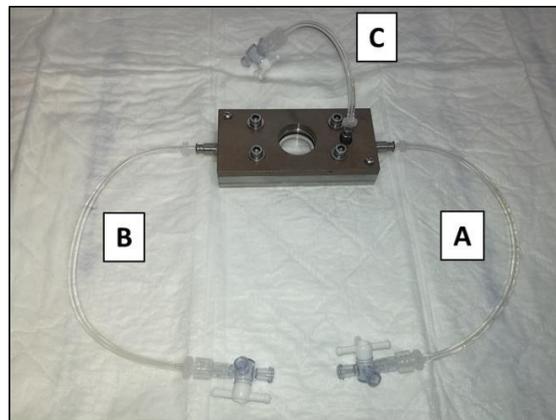


Figura 19. Montaje de la cámara paralela de flujo. El flujo leucocitario accederá al canal de la cámara a través de una conexión de entrada (A), atravesará el canal en el que los leucocitos entrarán en contacto con la superficie de 5 x 25 mm de la monocapa de células endoteliales y saldrá por la conexión de salida (B). Una tercera conexión en la parte anterior de la cámara permite la expulsión de posibles burbujas de aire del recorrido (C).

Esta cámara se colocó sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S) conectado a una videocámara (Sony Exware HAD) para que fuera posible la grabación de las imágenes (**Figura 20**). Para observar el flujo de leucocitos y su interacción con las células endoteliales se utilizó un objetivo 40×. La grabación se inició cuando se empezó a ver el paso de los leucocitos sobre la monocapa de células endoteliales y las imágenes fueron recogidas con el programa informático *NIS Elements AR program* durante 5 minutos en el mismo campo, en el que posteriormente se analizaron los parámetros de rodamiento y velocidad de rodamiento leucocitario. Para finalizar se grabaron 6 campos adicionales, sobre los que se analizó la adhesión leucocitaria al endotelio (**Figura 21**).

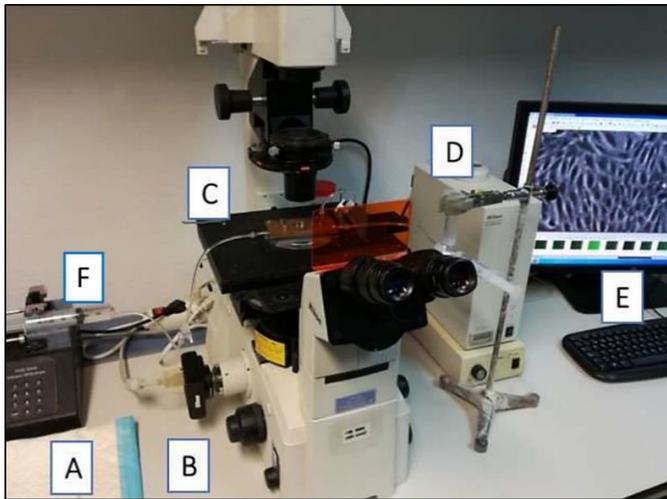


Figura 20. Montaje del sistema de cámara paralela de flujo sobre el microscopio invertido. (A) Bomba de infusión/succión. **(B)** Videocámara. **(C)** Cámara paralela de flujo. **(D)** Jeringa invertida con una suspensión de leucocitos (PMN o PBMC). **(E)** Ordenador conectado a la videocámara. **(F)** Jeringa de desechos conectada a la bomba.

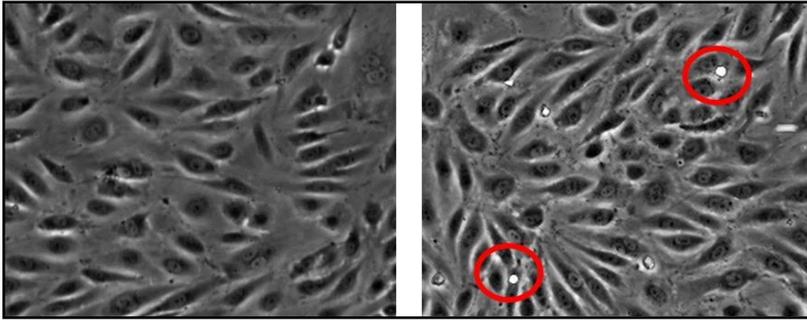


Figura 21. Imágenes representativas de la interacción leucocito-Endotelio. A la izquierda vemos una imagen de la monocapa de células HUVEC vista a través del microscopio. A la derecha, un par de leucocitos (PMNs) de paciente adheridos a la monocapa de HUVEC.

3.3.3.1. *Parámetros leucocitarios determinados.*

Los parámetros a determinar en las imágenes fueron (**Figura 8**):

- **Rodamiento leucocitario** (células/minuto): número de leucocitos que circulan a una velocidad inferior a la de los eritrocitos ya que están interaccionando con el endotelio vascular. Se analiza una zona fija de 100 μm durante 1 minuto. Mayor rodamiento equivale a mayor inflamación vascular.
- **Velocidad de rodamiento leucocitario** ($\mu\text{m/s}$): tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer 100 μm de monocapa endotelial. Se calcula haciendo la media de la velocidad de 20 leucocitos consecutivos. Menor velocidad equivale a mayor inflamación vascular.
- **Adhesión leucocitaria** (células adheridas/ mm^2): un leucocito se considera adherido al endotelio vascular si permanece estacionado o tiene un contacto estable con la monocapa endotelial durante un periodo igual o superior a 30 segundos (**Figura 21**). Mayor adhesión equivale a mayor inflamación vascular.

3.4. Estudio de la expresión de las moléculas de adhesión por citometría de flujo.

La expresión de moléculas de adhesión leucocitarias se determinó mediante citometría de flujo (FACSCalibur™ BD Biosciencias, Madrid, España) (Figura 22) en muestras de sangre entera de pacientes psoriásicos y donantes sanos (apartado 3.2.).

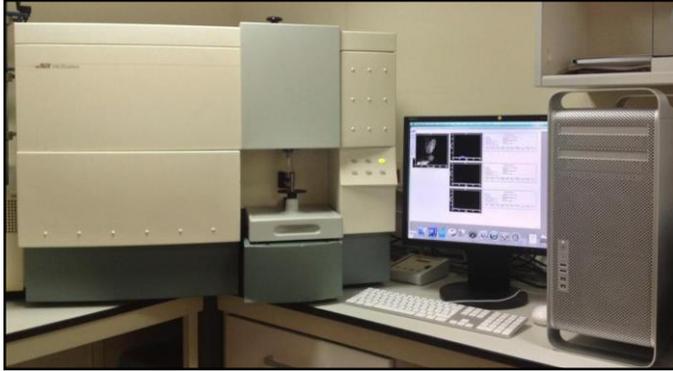


Figura 22. Citómetro de flujo FACS Calibur.

El citómetro de flujo identifica y clasifica las poblaciones leucocitarias -neutrófilos, monocitos y linfocitos- de acuerdo a sus características de tamaño (*forward scatter* -FSC- y *side scatter* -SSC-, respectivamente) (Figura 23).

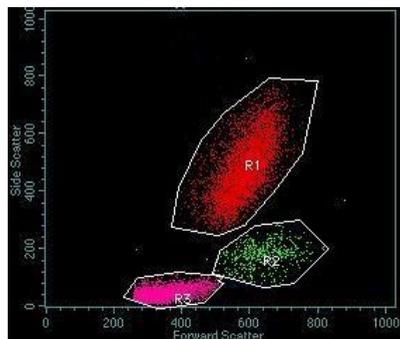


Figura 23. Identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias en el citómetro de flujo. La figura muestra un histograma representativo de las diferentes poblaciones leucocitarias separadas en función de sus características de tamaño (*forward scatter*) y granulosidad (*side scatter*) por el citómetro de flujo FACS calibur. Neutrófilos (R1), monocitos (R2) y linfocitos (R3).

La sangre se incubó durante 20 minutos a 4 °C en oscuridad, a saturación con los correspondientes anticuerpos frente a moléculas de adhesión: anti-CD11b (subunidad α de Mac-1), anti-CD18 (subunidad $\beta 2$ de integrinas) (CD18), anti-CD11a (subunidad α de LFA-1), anti-CD62L (subunidad de L-selectina) o con el isotipo control anti-IgG1, conjugados con fluoresceína isotiocianato (FITC); y con anti-CD11c (subunidad α de CR4) y anti-CD49d (subunidad de VLA-4) o con el isotipo control anti-IgG1, conjugados con ficoeritrina (PE). Posteriormente, las muestras se lisaron, lavaron y fijaron con solución de lisis (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) y se analizó la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias de neutrófilos y monocitos en el citómetro de flujo. La mediana de la intensidad de fluorescencia se empleó como marcador para determinar la expresión de las moléculas de adhesión, analizándose 10.000 eventos por cada muestra²¹⁶.

3.5. Estudio de los complejos plaqueta-leucocito por citometría de flujo.

La activación de plaquetas está asociada con su desgranulación y la formación de complejos plaquetas-leucocitos^{225,226} (PLC, del inglés *Platelet-Leukocyte Complex*). Los niveles de PLC son marcadores más sensibles de activación plaquetaria que la expresión de P-selectina de superficie²²⁷.

3.5.1. Porcentaje de complejos plaqueta-leucocito.

Para determinar el nivel de complejos plaqueta-neutrófilos (PNC, del inglés *Platelet-Neutrophil Complex*) y de complejos plaqueta-monocitos (PMC, del inglés *Platelet-Monocyte Complex*) se midió la cantidad de leucocitos CD41+ en sangre entera de voluntarios sanos y de pacientes *naïve*. El antígeno CD41, junto a CD61, forma el complejo glicoproteína GPIIb-IIIa (CD41/CD61), que es un marcador específico para

glicoproteínas constitutivas de la membrana plaquetaria. La existencia de CD41 en la población celular de leucocitos (neutrófilos o monocitos en nuestro caso), identificada por tamaño y granulosidad en un citómetro de flujo (**figura 23**), es indicativo de la presencia de plaquetas unidas a los leucocitos, y, por tanto, de PNC (en la población de neutrófilos) o de PMC (en la población de monocitos).

Para detectar CD41, la sangre se incubó a saturación con anticuerpo anti-CD41 o con el isotipo control anti-IgG1, ambos conjugados con PE, durante 20 minutos, a 4 °C en oscuridad. Posteriormente, las muestras se lisaron, lavaron y fijaron con la solución de lisis (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) y se analizó la expresión de CD41 mediante el citómetro de flujo. Se analizó, en 10.000 eventos por cada muestra²¹⁶, el **porcentaje de leucocitos CD41+** (**Figura 24**), lo que indica el número de leucocitos ocupados por, al menos, una plaqueta (porcentaje de PLC).

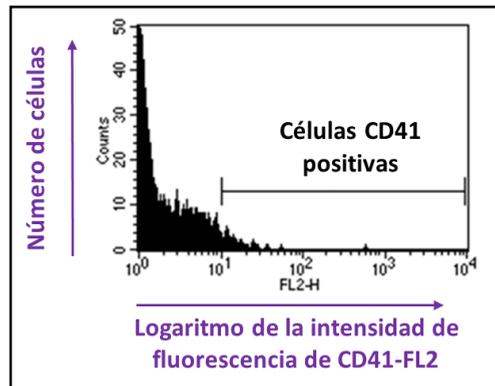


Figura 24. Histograma de fluorescencia de la evaluación de los niveles de complejos plaqueta-leucocito presentes en sangre entera. El citómetro de flujo separa las poblaciones leucocitarias en función de sus características de tamaño (*forward scatter*) y granulosidad (*side scatter*), de cada una de las poblaciones se obtiene un histograma como el de la imagen, en el que el eje de ordenadas corresponde al número de células analizadas y el eje de abscisas, al logaritmo de la intensidad de fluorescencia de CD41. Los leucocitos marcados con isotipo IgG1-PE nos permiten determinar el rango a partir del cual consideramos que las células son positivas para la expresión de CD41. FL2: canal de ficoeritrina.

3.5.2. Caracterización de complejos plaqueta-leucocito.

Además del porcentaje de PLC, para evaluar el tipo de perfil de estos PLC en los pacientes, se analizaron conjuntamente a este dato:

- La **media de la fluorescencia de CD41 en los leucocitos CD41+**: diferencias en dicha expresión sería indicativo de que hay cambios en la proporción de plaquetas que conforman cada complejo.
- La **mediana de la fluorescencia de CD18 en los leucocitos** (método descrito en el apartado 5).

La expresión media de CD41 en los PNC depende de la proporción de plaquetas presentes por cada complejo; la expresión de CD18 en neutrófilos indica el nivel de activación de estos. La interpretación conjunta de estos datos nos indica si el aumento de la cantidad de PNC se acompaña de una mayor activación de los neutrófilos y/o de un incremento de la proporción de plaquetas por cada complejo.

Además, para evaluar las diferencias en el estado de activación de los leucocitos libres frente a los leucocitos unidos a plaquetas, 40 μ L de sangre entera de voluntarios sanos y de pacientes *naïve* se incubó con un doble marcaje con anticuerpos a saturación: anti-CD41 (o isotipo anti-IgG1 como control negativo) conjugado con PE y anti-CD18 (o isotipo anti-IgG1) conjugado con FITC, para diferenciar 2 poblaciones (**Figura 25**):

- **Leucocitos CD18+/CD41-**: leucocitos libres.
- **Leucocitos CD18+/CD41+**: leucocitos unidos a plaqueta/s, es decir, PLC.

Posteriormente, las muestras se lisaron, lavaron y fijaron con la solución de lisis (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) y se analizaron en el citómetro de flujo. Las poblaciones leucocitarias se identificaron en función de sus características de tamaño y granulosidad (FSC y SSC, respectivamente) (**Figura 23**). Se procesaron 10.000 eventos por cada muestra y analizamos la mediana de la intensidad de fluorescencia de

CD18-FITC de los leucocitos CD18+/CD41- (leucocitos libres) y de los CD18+/CD41+ (leucocitos agregados a plaqueta/s).

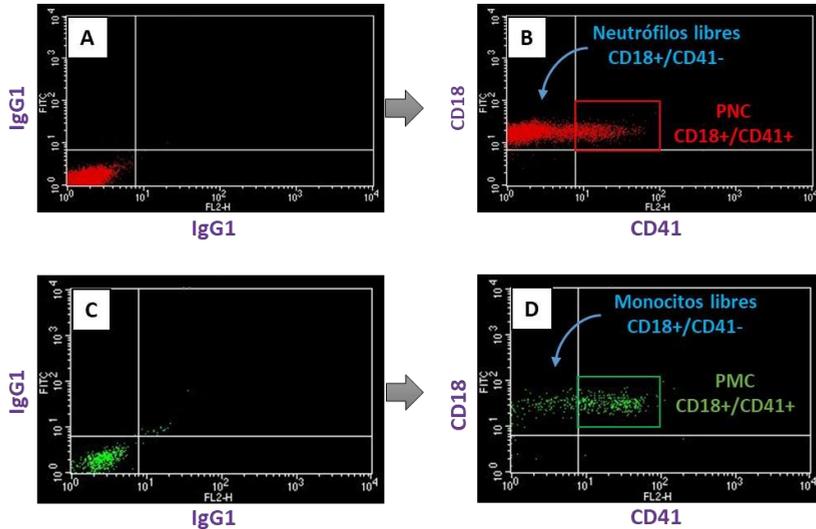


Figura 25. Diagramas de la caracterización de los complejos plaqueta-leucocito por citometría de flujo. A) Control negativo en neutrófilos. Neutrófilos marcados con isotipo IgG1-FITC e IgG1-PE, nos permite determinar el rango a partir del cual consideramos que las células son positivas para la expresión de una determinada molécula. B) Neutrófilos marcados con CD18-FITC y CD41-PE, distinguimos entre neutrófilos libres (CD18+/CD41-) y neutrófilos unidos a plaquetas o PNC (CD18+/CD41+). C) Control negativo en monocitos. Monocitos marcados con isotipo IgG1-FITC e IgG1-PE. D) Monocitos marcados con CD18-FITC y CD41-PE, distinguimos entre monocitos libres (CD18+/CD41-) y monocitos unidos a plaquetas o PMC (CD18+/CD41+). Ig: inmunoglobulina; PMC: complejos plaqueta-monocito; PNC: complejos plaqueta-neutrófilo.

Los datos de la caracterización de los PLC en los pacientes fueron comparados con los PLC originados por la estimulación con adenosín difosfato (ADP) y $\text{TNF}\alpha$. Para ello, 250 μL de sangre procedente de donantes sanos se trató con ADP 10 μM y $\text{TNF}\alpha$ 25 ng/mL, respectivamente, durante 30 minutos. Pasado el tiempo de tratamiento, la sangre tratada se incubó también con el mismo doble marcaje y se procesó y analizó de la misma manera que se describe en el párrafo anterior.

3.6. Medida del dímero D en plasma humano.

La sangre de los pacientes y de los individuos sanos recolectada en tubos de citrato sódico se centrifugó 20 minutos a $1500 \times g$ para la obtención de plasma, el cual fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para la determinación de la concentración de dímero D se utilizó el kit de ELISA *Human D-Dimer D2D* (Abyntek Biopharma S.L.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4. COMITÉS ÉTICOS.

Tanto el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia como el de Bioseguridad de la Universitat de València aprobaron el proyecto dentro del cual se enmarca este estudio con muestras de cordón umbilical humano y sangre humana. Todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado.

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia, así como de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana aprobó los estudios con animales de experimentación realizados en este trabajo, los cuales están en concordancia con las directrices institucionales para el cuidado y uso de animales de experimentación de laboratorio.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM). El tamaño de la muestra fue variable entre unos experimentos y otros, indicándose el número concreto en los pies de figura, manteniendo un tamaño equiparable entre grupos en cada ensayo. Las muestras procedentes de los pacientes fueron procesadas de acuerdo a las necesidades de cada etapa del estudio y a las limitaciones del proceso experimental, siendo utilizadas para analizar uno, varios o todos los parámetros incluidos en este trabajo.

El análisis de datos entre 3 o más grupos de distribución normal se realizaron con un análisis de varianza ANOVA de una vía, con la posterior corrección de Tukey; los de distribución no normal se compararon mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn. La comparación de datos entre 2 grupos se analizó con t test de Student no pareado; o con test de Mann-Whitney para distribución no normal. En la comparación entre el pretratamiento y el post-tratamiento, en el que cada paciente es su propio control, se usó el test t de Student pareado, en el caso de distribuciones normales, o el test pareado no paramétrico de Wilcoxon en caso contrario. Se consideró que la diferencia entre grupos es significativa cuando $p < 0,05$.



Resultados

1. RESULTADOS OBTENIDOS EN UN MODELO *IN VIVO* DE PSORIASIS INDUCIDA POR APLICACIÓN DE IMIQUIMOD.

1.1. Puesta a punto del modelo murino de psoriasis inducida por imiquimod.

En primer lugar, quisimos confirmar en un modelo murino la asociación entre la psoriasis y la existencia de inflamación sistémica vascular, ya que la bibliografía apunta a esta condición como principal mecanismo subyacente responsable del aumento del riesgo cardiovascular en pacientes psoriásicos.

Este modelo instaura en los ratones la condición psoriásica mediante la aplicación tópica diaria de IMQ durante un periodo de 6 días, generando lesiones psoriasiformes, hiperqueratosis, acantosis y eritema (**Figura 26 A**). En la tinción hematoxilina-eosina de la piel dorsal afectada de los animales (**Figura 26 B**) se aprecia como a partir de la segunda aplicación comienza a engrosarse la epidermis (acantosis), llegando al doble de su grosor inicial (**Figura 26 C**), y la descamación del estrato córneo. Tras el cuarto día, la descamación se agrava, la acantosis se multiplica y comienza a apreciarse elongación de las crestas epidérmicas en algunas zonas, aumento de infiltrado inflamatorio perivascular e hipogranulosis al inicio de la epidermis. En el día 6, último día de administración de IMQ, el grosor de la epidermis aumenta hasta cuatro veces el inicial, la elongación de las crestas epidérmicas es mayor y homogénea por toda la superficie, hay más infiltrado inflamatorio y la hipogranulosis es más marcada. Todos ellos son procesos característicos de lesiones psoriasiformes.

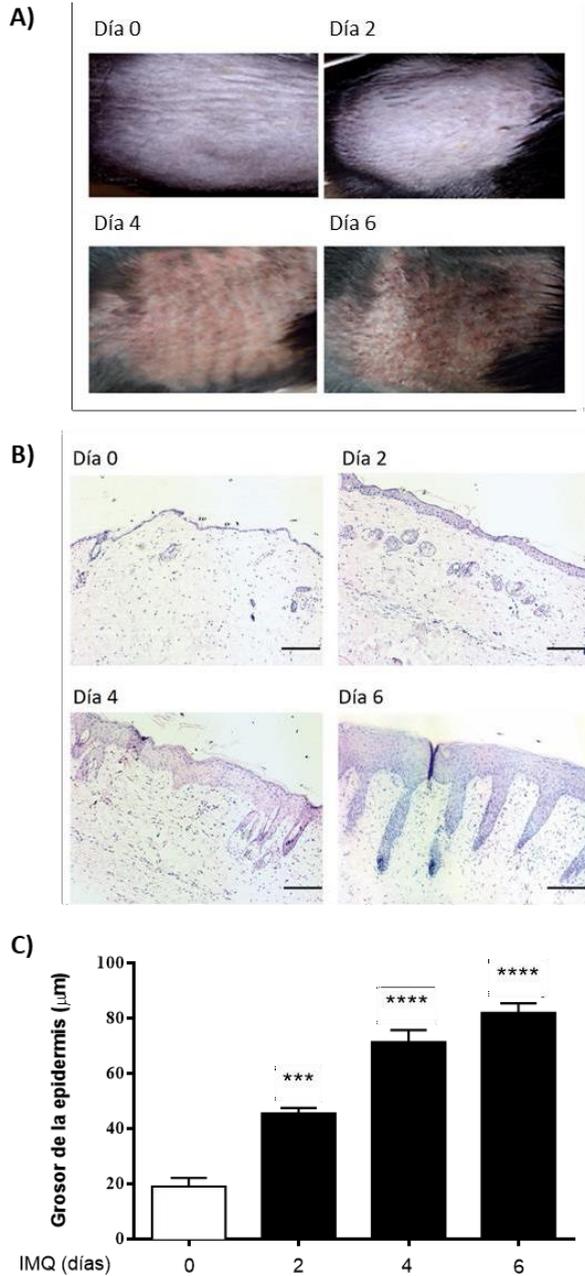


Figura 26. Manifestaciones cutáneas de la psoriasis inducida por imiquimod. A) Fenotipo macroscópico de la piel afectada. Imágenes representativas de piel dorsal de ratones sanos (día 0) y tratados con IMQ 2, 4 o 6 días. **B)** Tinción hematoxilina-eosina de la piel afectada (Barra = 200 μm). **C)** Acantosis, medida como grosor epidérmico. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (n = 4-5). *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo sin psoriasis inducida. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Tukey. IMQ: imiquimod.

Varios de los estudios que hacen uso de este modelo murino hacen referencia a un aumento de la masa esplénica en los ratones expuestos a IMQ^{228,229}. Valoramos los cambios en la masa esplénica con el fin de asegurar que se generaba una condición de alcance sistémico. Efectivamente, el tratamiento con IMQ indujo en nuestros animales un incremento de la masa del bazo comparado con el grupo control; además, fue un cambio que se instauró y se mantuvo desde el segundo día de tratamiento con IMQ (**Figura 27**).

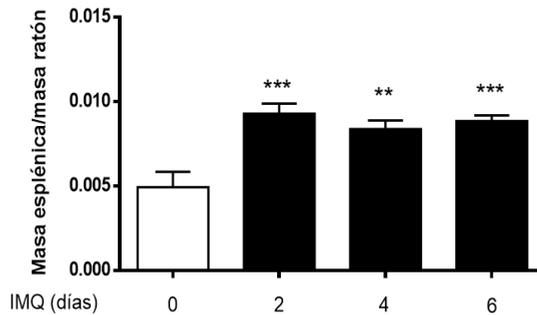


Figura 27. Cambio en la masa esplénica inducido por el tratamiento con imiquimod. Los bazos fueron extraídos tras sacrificar al ratón y almacenados a -80 °C hasta su uso. Se pesaron en una balanza de precisión y se relativizaron al peso total del correspondiente ratón. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM ($n = 4-5$). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). IMQ: imiquimod.

1.2. Manifestaciones cardiovasculares tras la inducción e instauración de la psoriasis.

Una vez comprobado que el modelo se ha instaurado tanto a nivel cutáneo como sistémico, pasamos a evaluar el perfil inflamatorio y su posible repercusión cardiovascular. Para ello, analizamos dos aspectos claves de la disfunción y respuesta inflamatoria vasculares:

1) las interacciones celulares leucocito-endotelio, determinando la velocidad de rodamiento y adhesión de los leucocitos sobre el endotelio, paso inicial en la formación de la placa aterosclerótica; y

2) la formación de trombos.

1.2.1. Interacción leucocito-endotelio en vénulas cremastéricas de ratón con psoriasis inducida.

Observamos, en las vénulas cremastéricas de los ratones mediante microscopía intravital, un incremento de la interacción leucocito-endotelio tras 6 días de administración tópica de IMQ (**Figura 28**). A los 4 días de inicio del modelo con IMQ, ya se aprecia un marcado enlentecimiento de la velocidad de los leucocitos en fase de rodamiento, que se mantiene reducida al instaurarse la psoriasis en el día 6 (**Figura 28 A**). En el sexto día, además, se observa un aumento significativo de la adhesión de leucocitos a la pared vascular (**Figuras 28 y 29**).

Este efecto se inició de forma paralela a la aparición de las lesiones cutáneas vistas en el apartado anterior, alcanzando su punto máximo también a los 6 días, cuando la lesión psoriásica estaba completamente establecida.

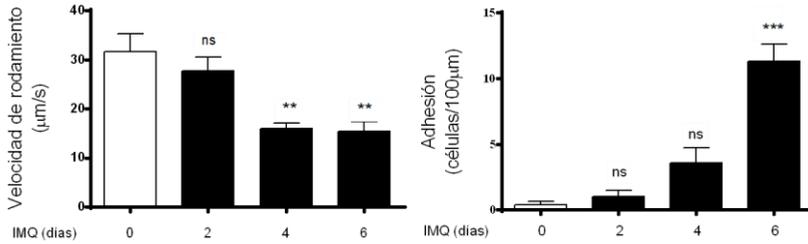


Figura 28. Efecto de la psoriasis inducida con imiquimod sobre la interacción leucocito-endothelio. Para la evaluación de la interacción leucocito-endothelio, después de la cirugía para exponer el músculo cremáster, se grabaron varias vénulas cremastéricas durante 5 minutos y, posteriormente, en la grabación se analizaron los parámetros de velocidad de rodamiento y adhesión leucocitarias. **A)** Velocidad de rodamiento leucocitaria. Se analizó la velocidad de los leucocitos en rodamiento que pasaron durante 1 minuto de video contando los segundos que tardaban en atravesar 100 µm. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (n = 6 – 7). **p < 0,01 respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). **B)** Adhesión leucocitaria. Se consideran adheridos aquellos leucocitos que se mantenían adheridos a la pared del vaso durante al menos 30 segundos. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (n = 6 – 7). ***p < 0,001 respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). IMQ: imiquimod.

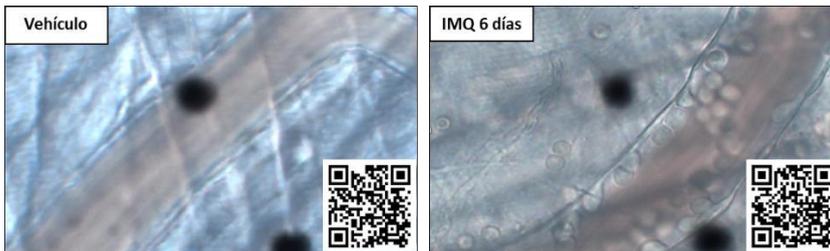


Figura 29. Imágenes obtenidas en la microscopía intravital de vénulas cremastéricas. Imágenes representativas de ratones sanos (control) frente a ratones con psoriasis inducida tras 6 días de aplicación repetida con IMQ (imagen de la derecha). Los círculos translúcidos en el interior de las vénulas son leucocitos interactuando con el endotelio; los que vemos en el exterior de los vasos son leucocitos que han migrado al tejido. IMQ: imiquimod. El código QR embebido en cada imagen enlaza con los vídeos originales de los cuales se toman estas capturas representativas.

1.2.2. Trombosis inducida en arteriola cremastérica de ratón con psoriasis inducida.

Para comprobar si en nuestro modelo experimental el aumento detectado en dichas interacciones derivaba en la formación de un trombo, se empleó el modelo de daño vascular inducido por FeCl_3 . En la arteriola de ratones con psoriasis (6 días con IMQ) se producía una oclusión rápida tras aplicar FeCl_3 (Figura 30 y 31) a una concentración que en los ratones sanos no tiende a generar trombosis. El tiempo que tardaba en producirse la oclusión fue significativamente menor desde el segundo día de aplicación de IMQ y fue disminuyendo en paralelo con la instauración de la psoriasis. En el grupo experimental sin psoriasis inducida (0 días con IMQ), la misma concentración de FeCl_3 no provocaba cambios en el flujo sanguíneo.

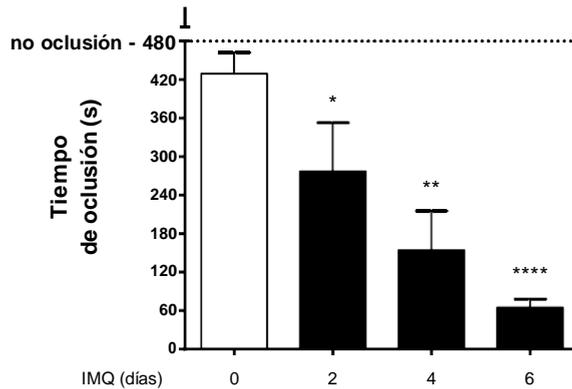


Figura 30. Efecto de la psoriasis inducida por imiquimod sobre la formación de trombos *in vivo*. En la gráfica se observa el tiempo de oclusión (s) tras el contacto con el cloruro férrico 50 mM en ratones sanos o tratados con IMQ diario 2, 4 o 6 días, respectivamente. Para determinar cómo impacta la disfunción vascular provocada por la psoriasis inducida sobre la formación de trombos, se perfundió una solución de cloruro férrico (FeCl_3 , 50 mM) sobre las arteriolas del músculo cremáster y fueron visualizadas por microscopía intravital hasta que el flujo sanguíneo cesó -en caso de oclusión- o hasta un máximo de 8 minutos -en el caso de que no haya oclusión.. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (n = 8-10). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). IMQ: imiquimod; s: segundos.

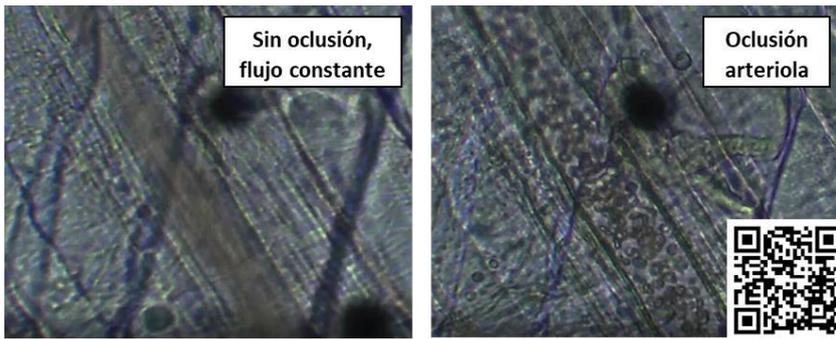


Figura 31. Fotograma representativo de trombo producido en un ratón tratado 6 días con imiquimod tópico. En la imagen de la izquierda el flujo sanguíneo en la vena es continuo y estable, correspondiente a los minutos anteriores a la oclusión, la cual tiene lugar antes de los 8 minutos de grabación y se puede apreciar en la foto de la derecha. El código QR enlaza con el vídeo de la formación del trombo en un ratón con psoriasis inducida.

Además, se midieron las concentraciones de dímero D (DD) en el suero de los animales incluidos en el estudio para descartar diferencias importantes de actividad trombótica y trombolítica subclínica²³⁰ que pudieran sesgar los resultados (**Tabla 9 en el anexo**).

1.3. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las manifestaciones cutáneas y cardiovasculares de la psoriasis inducida en un modelo murino.

1.3.1. Efecto sobre el daño cutáneo y el aumento de masa esplénica.

La acantosis dérmica establecida en los ratones con IMQ no se vio modificada por la administración de una sola dosis de ninguno de los fármacos biológicos empleados (ADA, INF, ETA, SEC o UST) (Figura 32 y 33).

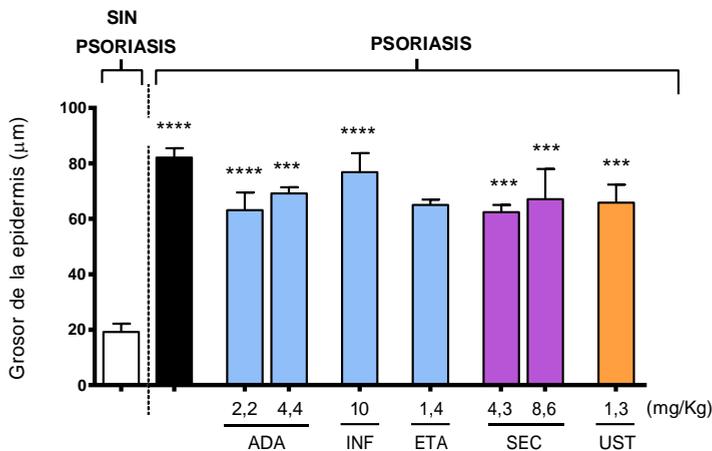


Figura 32. Acantosis 24 horas después del tratamiento con un biológico. Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con diferentes biológicos usados en la terapia de la psoriasis (ADA 2,2 y 4,4 mg/kg, i.p.; INF 10 mg/kg, i.v.; ETA, 1,4 mg/kg, i.p.; SEC 4,3 y 8,6 mg/kg, i.p.; y UST 1,3 mg/kg, i.p.). **B) Acantosis.** Los resultados son expresados como media \pm EEM (n = 4). *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). ADA: adalimumab; ETA: etanercept; INF: infliximab; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab.

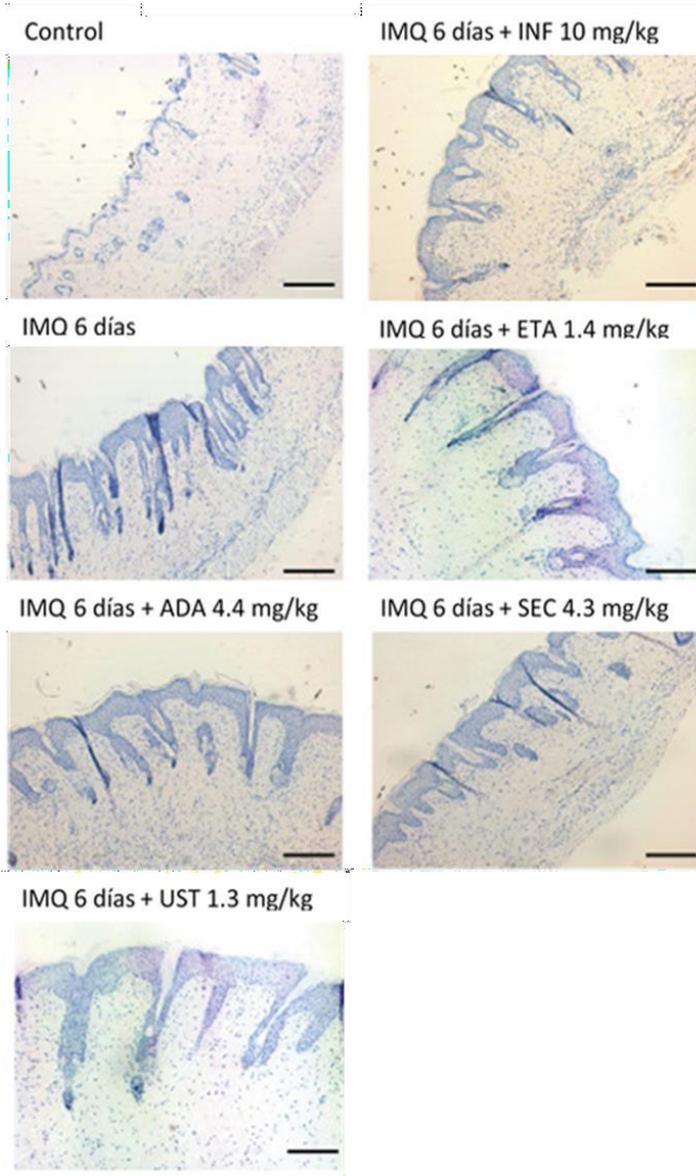


Figura 33. Imágenes representativas de la piel dorsal de los ratones teñida con tinción hematoxilina-eosina. Barra = 200 μm . Considerando la piel de un ratón que no ha recibido IMQ como imagen control. IMQ: imiquimod; ADA: adalimumab; INF: infliximab; ETA: etanercept; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab.

El incremento de la masa esplénica tampoco se vio afectado con una sola administración de los fármacos (Figura 34).

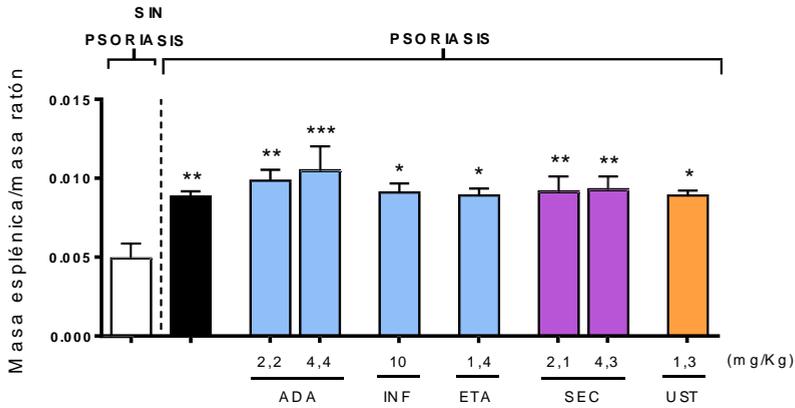


Figura 34. Masa esplénica 24 horas después del tratamiento con un biológico.

Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con diferentes biológicos usados en la terapia e la psoriasis (ADA 2,2 y 4,4 mg/kg, i.p.; INF 10 mg/kg, i.v.; ETA 1,4 mg/kg, i.p.; SEC 2,1; 4,3 y 8,6 mg/kg, i.p.; y UST 1,3 mg/kg, i.p.). Los bazo fueron extraídos tras sacrificar al ratón y almacenados a -80°C hasta su uso. Se pesaron en una balanza de precisión y se relativizaron al peso total del correspondiente ratón. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (n = 5-7). *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). ADA: adalimumab; INF: infliximab; ETA: etanercept; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab.

En cuanto al metotrexato, ni el tratamiento de una sola dosis, ni la administración continuada durante 6 días lograron tampoco reducir la acantosis (**Figura 35 A**). La dosis única tampoco revirtió el incremento de la masa esplénica, sin embargo, con la pauta repetida de 6 días se evitó ese incremento, obteniendo un ratio masa bazo/masa ratón similar al de los ratones sanos (**Figura 35 B**).

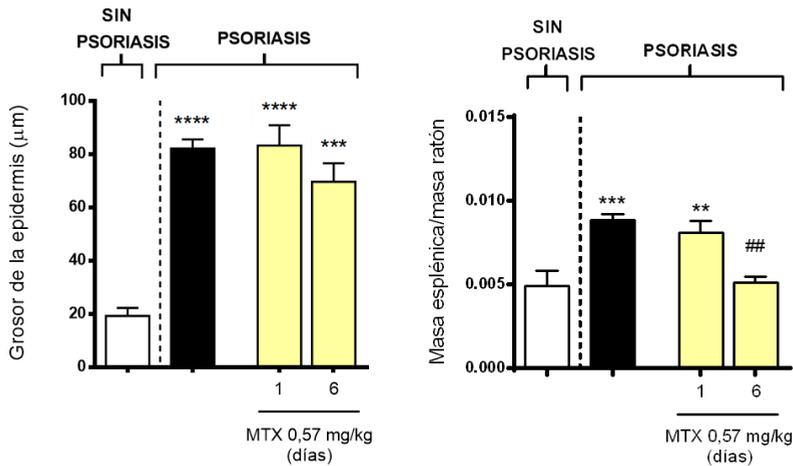


Figura 35. Efecto de metotrexato sobre la acantosis y sobre el incremento de la masa esplénica. Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con MTX 0,57 mg/kg i.p. una sola vez 1 día antes del sacrificio (grupo 1 día) o con una dosis diaria durante 6 días mientras se inducía la psoriasis (grupo 6 días). **A) Cambio en la masa esplénica inducido por el tratamiento con IMQ.** ***p<0,001 y ****p<0,0001 frente al valor correspondiente en el grupo sin psoriasis inducida (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). **B) Efecto del tratamiento con MTX sobre el incremento en la masa esplénica inducido por el tratamiento con IMQ.** Los bazo fueron extraídos tras sacrificar al ratón y almacenados a -80°C hasta su uso. Se pesaron en una balanza de precisión y se relativizaron al peso total del correspondiente ratón. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (n = 5-7). **p<0,01 y ***p<0.001 respecto al grupo sin psoriasis inducida. ##p<0,01 respecto al grupo con psoriasis sin tratamiento (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). MTX: metotrexato.

1.3.2. Efectos de la terapia sobre la interacción leucocito-endotelio en vénulas cremastéricas de ratón con psoriasis inducida.

Los tres fármacos anti-TNF α (ADA, INF y ETA) y el anti-IL17 (SEC) sí que lograron revertir el aumento de las interacciones leucocito-endotelio que acompañan a la psoriasis inducida por IMQ, disminuyendo de forma estadísticamente significativa y dosis-dependiente la adhesión de los leucocitos a la pared vascular de las vénulas del ratón (Figura 36). Por el contrario, el anti-IL-12/23 (UST), incluso en dosis supraterapéuticas, no revirtió significativamente el reclutamiento de leucocitos (Figura 36).

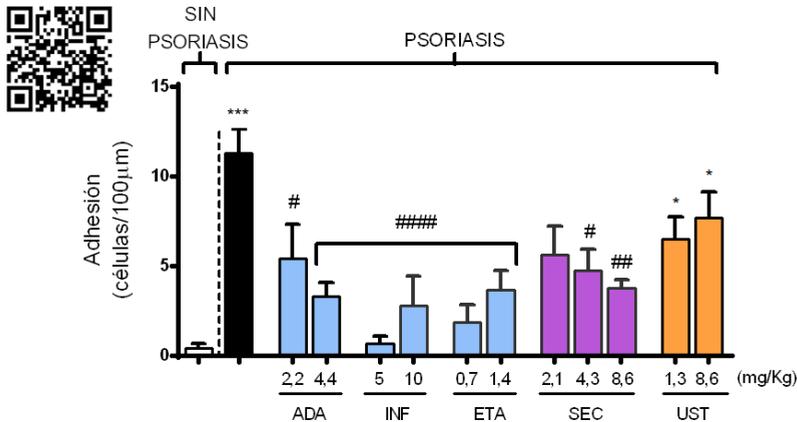


Figura 36. Efecto de los fármacos biológicos sobre la interacción leucocito-endotelio de ratones con psoriasis inducida con imiquimod. Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con diferentes biológicos usados en la terapia e la psoriasis (ADA 2,2 y 4,4. mg/kg, i.p.; INF 5 y 10 mg/kg, i.v.; ETA 0,7 y 1,4 mg/kg, i.p.; SEC 2,1, 4,3 y 8,6 mg/kg, i.p.; y UST 1,3 y 8,6 (supraterapéutica) mg/kg, i.p.). Para la evaluación de la interacción leucocito- endotelio, se realiza una cirugía para exponer el músculo cremáster, se grabaron varias vénulas cremastéricas durante 5 minutos y, posteriormente, en la grabación se analizó el parámetro de adhesión. Se consideran adheridos aquellos leucocitos que se mantienen adheridos a la pared del vaso durante al menos 30 segundos. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (n = 6-7). *p<0,05 y ***p<0,001 respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). #p<0,05, ##p<0,01 y ####p<0.0001 respecto al grupo con psoriasis sin tratamiento (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). ADA: adalimumab; INF: infliximab; ETA: etanercept; SEC:

secukinumab; UST: ustekinumab. Código QR con enlace directo a un vídeo representativo del efecto del tratamiento con ADA sobre la adhesión leucocito-endotelio.

Por su parte, el tratamiento clásico con metotrexato en una sola dosis no consigue disminuir de manera significativa el nivel de leucocitos adheridos a la pared de la vénula con respecto al de los ratones enfermos que no reciben ningún tratamiento (**Figura 37**). Sin embargo, con la administración de una pauta de dosis repetidas durante 6 días, en paralelo a la aplicación de IMQ sí que se observa una disminución significativa en la adhesión con respecto a los ratones enfermos sin tratamiento antipsoriásico (**Figura 37**).

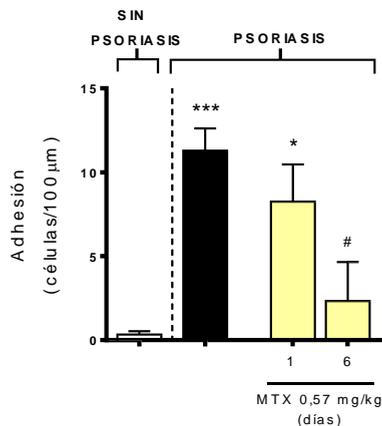


Figura 37. Efecto de metotrexato sobre la interacción leucocito-endotelio de ratones con psoriasis inducida con imiquimod. Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con MTX 0,57 mg/kg i.p.: una sola vez 1 día antes del sacrificio (grupo 1 día) o con una dosis diaria durante 6 días mientras se inducía la psoriasis (grupo 6 días). Para la evaluación de la interacción leucocito-endotelio, se realizó una cirugía para exponer el músculo cremáster, se grabaron vénulas cremastéricas durante 5 minutos y, *a posteriori*, en el vídeo se analizó el parámetro de adhesión. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (n = 3). * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). # $p < 0,05$ respecto al grupo con psoriasis sin tratamiento (distribución normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey). MTX: metotrexato.

1.3.3. Efectos de la terapia sobre la tendencia a la formación de trombos en arteriola cremastérica de ratón con psoriasis inducida.

En cuanto a la tendencia a la formación de trombos, los anti-TNF α (ADA, INF y ETA) y el anti-IL17A (SEC) aumentaron significativamente el tiempo transcurrido entre la adición del FeCl $_3$ y la oclusión del vaso, esto es, redujeron la tendencia a la trombosis. Por el contrario, el anti-IL-12/23 (UST), incluso en dosis supraterapéuticas, no protegió de la oclusión de los vasos en ratones con psoriasis (Figura 38).

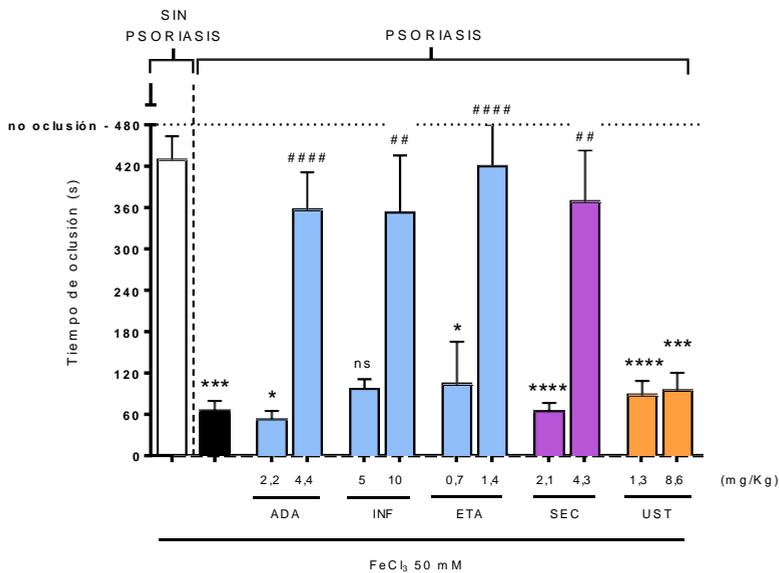


Figura 38. Efecto de los biológicos sobre la tendencia a la formación de trombo en ratones con psoriasis inducida con imiquimod. Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con diferentes biológicos usados en la terapia e la psoriasis (ADA 2,2 y 4,4 mg/kg, i.p.; INF 5 y 10 mg/kg, i.v.; ETA, 0,7 y 1,4 mg/kg, i.p.; SEC 2,1 y 4,3 mg/kg, i.p.; y UST 1,3 y 8,6 (supraterapéutica) mg/kg, i.p.). Para determinar el impacto de la disfunción vascular generada con el aumento de la interacción leucocito-endotelio sobre la formación de trombos, se realiza una cirugía para exponer el músculo cremáster y perfundimos una solución de cloruro férrico (FeCl $_3$, 50 mM) sobre las arteriolas de dicho músculo y las visualizamos por microscopía intravital hasta que el flujo sanguíneo cesa -en caso de oclusión- o hasta un máximo de 8 minutos -en el caso de que no haya oclusión-. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (n = 6-7). *p<0,05 y ***p<0,001 respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución no normal, test no

paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,0001$ respecto al grupo con psoriasis sin tratamiento (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). ADA: adalimumab; INF: infliximab; ETA: etanercept; s: segundos; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab. Código QR con enlace directo a un vídeo representativo de la ausencia de oclusión en la arteriola de un ratón con psoriasis inducida tratado 24 horas con ADA.

MTX, en administración única o múltiple, no aumentó el tiempo transcurrido antes de la oclusión de los vasos en ratones con psoriasis inducida por IMQ (Figura 39).

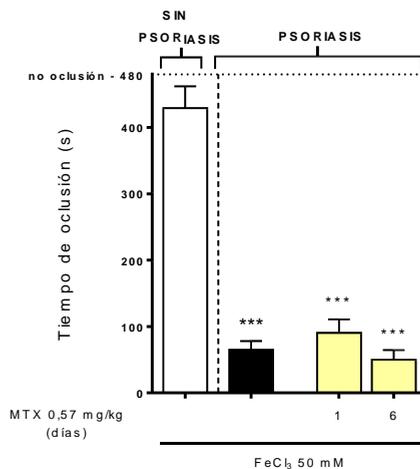


Figura 39. Efecto de metotrexato sobre la tendencia a la formación de trombo en ratones con psoriasis inducida con imiquimod. Los ratones con psoriasis inducida fueron tratados con MTX 0,57 mg/kg i.p.: una sola vez 1 día antes del sacrificio (grupo 1 día) o con una dosis diaria durante 6 días mientras se inducía la psoriasis (grupo 6 días). Para determinar el impacto de la disfunción vascular generada con el aumento de la interacción leucocito-endotelio sobre la formación de trombos, se realiza una cirugía para exponer el músculo cremáster y profundimos una solución de cloruro férrico (FeCl_3 , 50 mM) sobre las arteriolas de dicho músculo y las visualizamos por microscopía intravital hasta que el flujo sanguíneo cesa -en caso de oclusión- o hasta un máximo de 8 minutos -en el caso de que no haya oclusión-. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (n = 5-7). *** $p < 0,001$ y *** $p < 0,001$ respecto al grupo sin psoriasis inducida (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). MTX: metotrexato; s: segundos.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES CON PSORIASIS.

2.1. Caracterización del estado proinflamatorio vascular de pacientes con psoriasis en placa moderada-severa no controlada.

2.1.1. *Expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y monocitos de pacientes naïve.*

Las $\beta 2$ son las principales integrinas involucradas en la mediación de la adhesión leucocitaria al endotelio (**Tabla 1**), por este motivo se evaluaron mediante citometría de flujo en neutrófilos las subunidades CD11a, CD11b, CD11c, y la subunidad que todas tienen en común, CD18, en neutrófilos y monocitos procedentes de sangre entera de voluntarios sanos o pacientes *naïve*. En la población de monocitos también se determinó CD49d, subunidad de VLA-4 (CD49d/CD29), ya que esta tiene gran relevancia en monocitos. En ambas poblaciones se evaluó además la subunidad CD62L, perteneciente a L-selectina. Esta molécula es excretada de los leucocitos cuando estos son activados, por lo que en este caso una disminución de la expresión indicaría activación leucocitaria.

En una muestra de 14 individuos sanos y 14 pacientes *naïve* (pacientes con psoriasis moderada-grave que aún no han recibido tratamiento), se observa que los neutrófilos de los pacientes *naïve* expresan niveles significativamente más altos de las subunidades CD11b, CD11c y CD18 que la población de donantes sanos (**Figura 40 A y B**), lo que implica una sobreexpresión de Mac-1 (CD18/CD11b) y CR4 (CD18/CD11c). Por otro lado, en la población de monocitos los pacientes no presentan cambios significativos en la expresión de ninguna de las moléculas analizadas, sólo una ligera tendencia a la activación de CD62L y en CD49d (**Figura 40 C**).

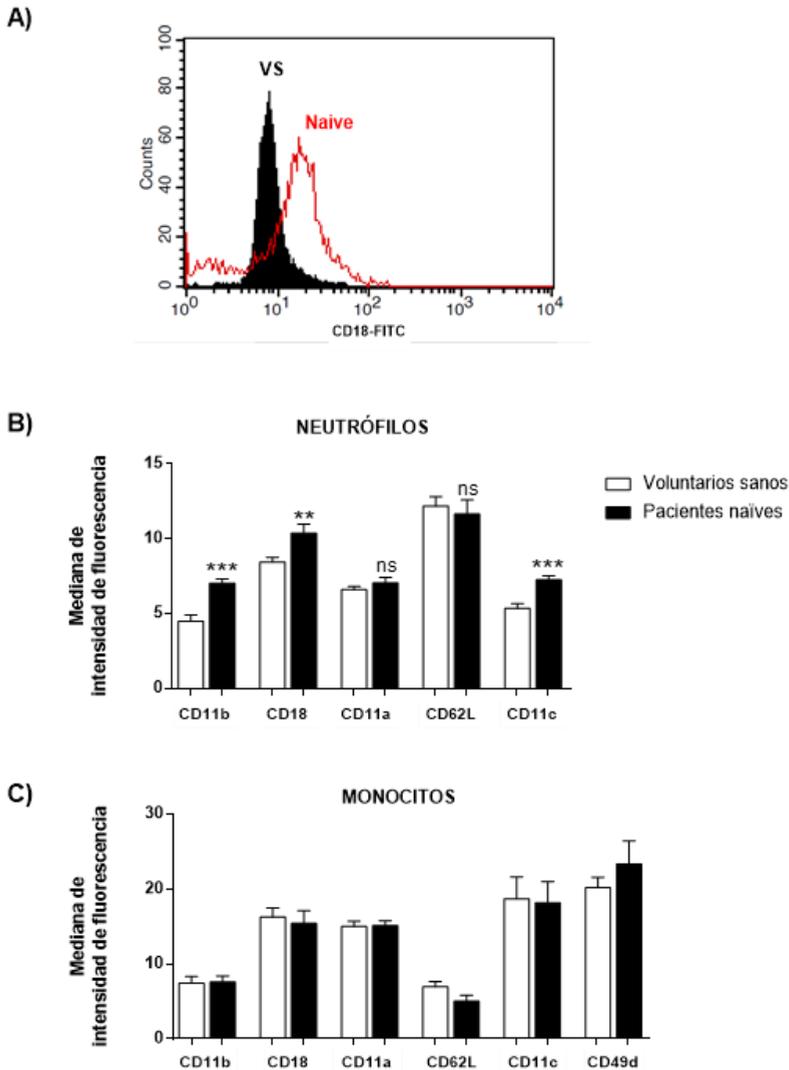


Figura 40. Expresión de moléculas de adhesión en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (naïve). La adhesión de neutrófilos y monocitos a las células endoteliales es mediada por la interacción de integrinas $\beta 1$ VLA-4 (CD49d/CD29), integrinas $\beta 2$ LFA-1 (CD18/CD11a), Mac-1 (CD18/CD11b) y/o CR4 (CD18/CD11c) y L-selectina (CD62L) con las moléculas de adhesión endoteliales. Se evaluó la expresión de estas subunidades en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico. **A) Histograma de la expresión de CD18 de una muestra representativa de un voluntario sano frente a un paciente naïve.** **B) Expresión de las moléculas de adhesión en neutrófilos.** **C) Expresión de las moléculas de adhesión en monocitos.** Los resultados son expresados como mediana \pm EEM (n = 14). **p<0,01 y ***p<0,001 respecto a la expresión de la misma molécula en voluntarios sanos (distribución normal, t-test de Student no pareado). FITC: isotiocianato de fluoresceína; ns: no significativo.

2.1.2. Interacción leucocito-endotelio de PMNs y PBMCs de pacientes naïve.

Para determinar si la sobreexpresión de las moléculas de adhesión en los pacientes se traduce en una mayor interacción leucocito-endotelio, se abordó este fenómeno desde un punto de vista funcional mediante ensayos de adhesión en cámara paralela de flujo.

Se evaluó la interacción leucocito-endotelio a partir de PMNs y PBMCs aislados de sangre entera de los pacientes *naïve* sobre células HUVEC sanas. Siempre que hablemos de este tipo de interacción con células humanas haremos alusión a 3 parámetros: el número de leucocitos en fase de rodamiento, la velocidad de dicho rodamiento y la adhesión de estos sobre el endotelio vascular.

Se observó, en una muestra de 11 – 13 individuos, una disminución en la velocidad de rodamiento de los PMNs y un aumento del número de PMNs en estado de rodamiento, ambos significativos, junto a una tendencia a un mayor número de PMNs adheridos a la monocapa endotelial, aunque esto último no de modo significativo (**Figura 41**). Los PBMCs presentan también en los tres parámetros citados una tendencia a la activación, pero sin llegar a ser significativa ni para el número de PBMCs en estado de rodamiento ni para su velocidad, pero sí para el proceso final de adhesión (**Figura 41**).

Además, se midieron las concentraciones de DD en el plasma de una muestra representativa de los pacientes incluidos en el estudio para descartar diferencias importantes de actividad trombotica y trombolítica subclínica²³⁰ que pudieran sesgar los resultados (**Tabla 10 en el anexo**).

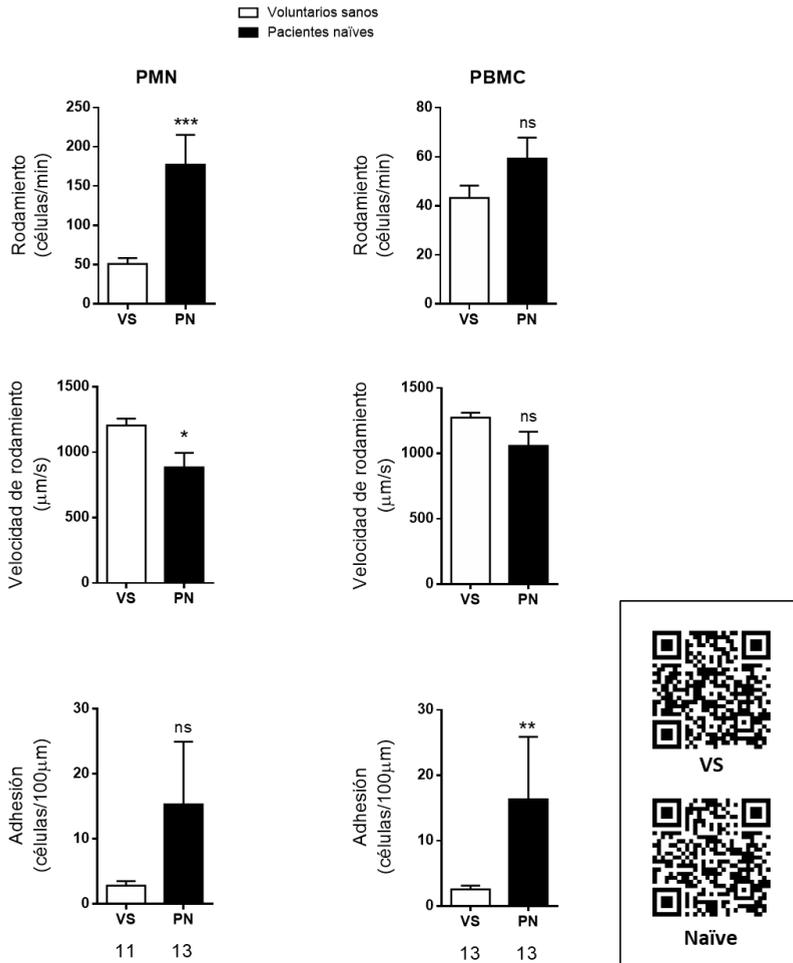


Figura 41. Interacción leucocito-entotelio en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (naïve). Las interacciones entre los PMNs (izquierda) o PBMCs (derecha) de pacientes con psoriasis sin tratamiento sistémico previo (naïve) y células endoteliales de donantes sanos fueron analizadas usando una cámara paralela de flujo en un modelo *in vitro*, en el que las condiciones del flujo mimetizan el flujo dinámico que se da *in vivo*. Las imágenes se registraron en un solo campo de visión durante un período de 5 minutos durante el cual se determinó (a) la velocidad de rodamiento, (b) el flujo de rodamiento y (c) la adhesión a la monocapa confluyente de células endoteliales. Los resultados son expresados como mediana ± EEM (n = 11-13). *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 respecto al grupo de voluntarios sanos (si la distribución es normal: t-test de Student no pareado de dos colas; si la distribución era no normal: test de Mann-Whitney de dos colas). ns: no significativo; PBMC: célula mononuclear de sangre periférica; PMN: célula polimorfonuclear; PN: pacientes naïve; VS: voluntarios sanos. Códigos QR con enlace directo a videos representativos de la interacción PMN-endotelio de un voluntario sano y de un paciente naïve.

2.2. Impacto de las diferentes terapias sistémicas sobre el estado proinflamatorio vascular asociado a la psoriasis moderada-severa.

2.2.1. Efectos de la terapia sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes con psoriasis en remisión clínica.

En los neutrófilos de pacientes con psoriasis moderada-grave en remisión por estar recibiendo tratamiento (12 - 14 por cada grupo de tratamiento) con ADA o SEC, la expresión de las subunidades CD11a y de CD62L no estaba elevada respecto a la de los voluntarios sanos (**Figura 42**). En este caso, a diferencia de lo observado en los *naïve*, la expresión de CD11c, CD18 y CD11b tampoco presentaba niveles elevados respecto a la de los voluntarios sanos (**Figuras 42 A, B, C y E**). Sin embargo, CD11c, CD18 y CD11b sí mostraban mayor expresión en pacientes tratados con UST, también en remisión clínica, con respecto a los leucocitos de individuos sanos (**Figuras 42 D y E**). En los monocitos no hay diferencias en la expresión de ninguna de las moléculas de adhesión entre ninguno de los grupos de pacientes con respecto al de los voluntarios sanos (datos no mostrados).

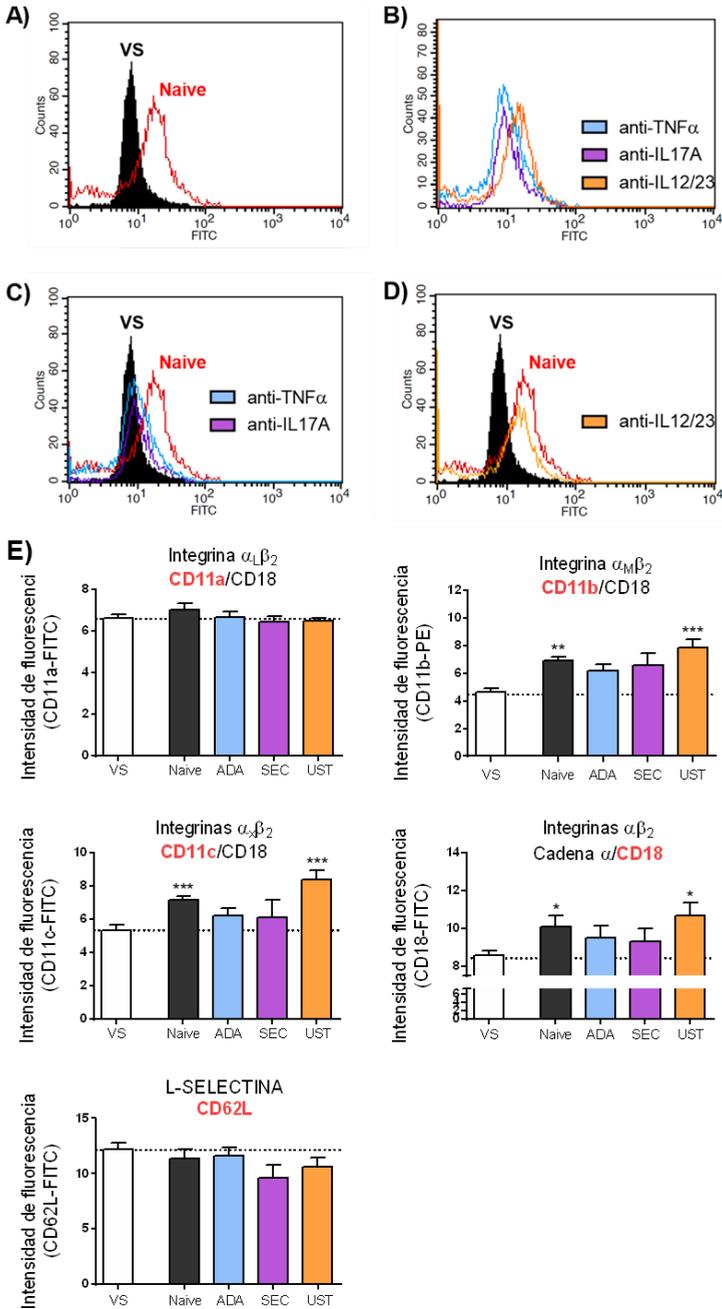


Figura 42. Efecto de los fármacos biológicos sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes con psoriasis moderada-grave. La adhesión de neutrófilos a las células endoteliales es mediada por la interacción de las integrinas β_2 LFA-1 (CD18/CD11a), Mac-1 (CD18/CD11b) y/o CR4 (CD18/CD11c) y

RESULTADOS

L-selectina (CD62L) con las moléculas de adhesión endoteliales. Evaluamos el efecto de los biológicos sobre la expresión de estas subunidades. **A)** Histograma de una muestra representativa de la expresión de CD18 de un voluntario sano frente a uno *naïve*. **B)** Histograma de muestras representativas de la expresión de CD18 de cada uno de los tratamientos. **C)** Histograma de una muestra representativa de la expresión de CD18 con ADA (anti-TNF α) y SEC (anti-IL17A) frente a voluntarios sanos y *naïve*. **D)** Histograma de una muestra representativa de la expresión de CD18 con UST (anti-IL12/23) frente a un voluntario sano y uno *naïve*. **E)** Los resultados son expresados como mediana \pm EEM (n = 12-14). *p<0,05, y***p<0,001 respecto a la expresión en voluntarios sanos (cuando la distribución fue normal, test ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey; cuando la distribución era no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). ADA: adalimumab; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab; VS: voluntarios sanos.

Estas mismas 3 subunidades, CD11c, CD18 y CD11b, también estaban más expresadas en neutrófilos de pacientes en tratamiento con MTX, con respecto a los de población sana (**Figura 43**).

Por tanto, el bloqueo de TNF α y de IL-17A, con ADA y SEC respectivamente, es capaz de revertir el incremento en la expresión de CR4 y de MAC-1 de los neutrófilos; no así el bloqueo de IL12/23 con UST, ni con el uso de MTX.

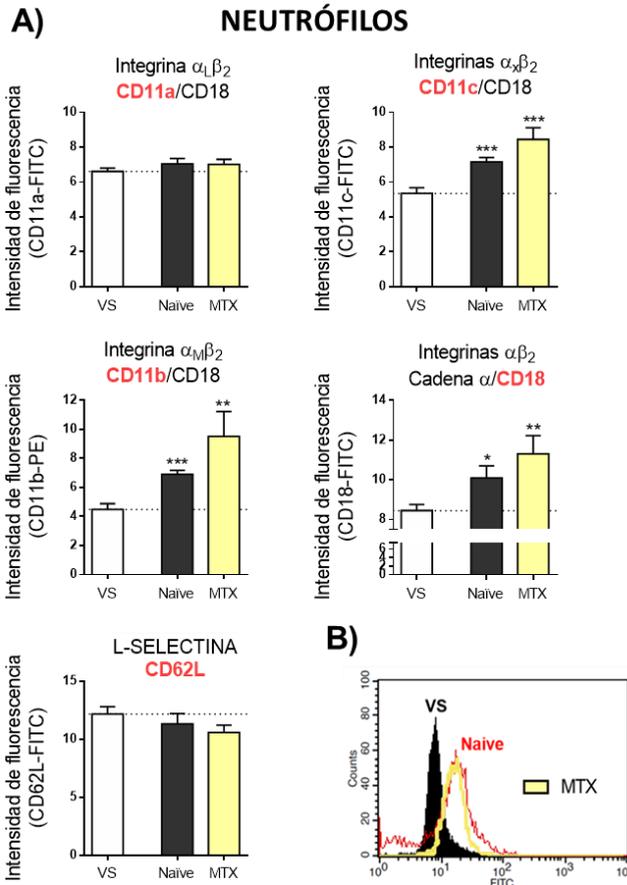


Figura 43. Efecto de metotrexato sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de pacientes con psoriasis moderada-grave. La adhesión de neutrófilos y monocitos a las células endoteliales es mediada por la interacción de integrinas β_2 LFA-1 (CD18/CD11a), Mac-1 (CD18/CD11b) y/o CR4 (CD18/CD11c) y L-selectina (CD62L) con las moléculas de adhesión endoteliales. Evaluamos el efecto de metotrexato sobre la expresión de estas subunidades. **A)** Los resultados son expresados como mediana \pm EEM ($n = 11-14$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente a la expresión en voluntarios sanos (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). **B)** Histograma de una muestra representativa de la expresión de CD18 en un paciente tratado con MTX frente a un voluntario sano y uno *naïve*. FITC: isotiocianato de fluoresceína; MTX: metotrexato; PE: ficoeritrina; VS: voluntarios sanos.

2.2.2. Efectos de la terapia sobre la interacción leucocito-endotelio de PMNs y PBMCs de pacientes con psoriasis en remisión clínica.

En el estudio funcional en cámara paralela de flujo (10-12 individuos por grupo), los leucocitos de pacientes en tratamiento habitual con anti-TNF α (ADA) o anti-IL-17 (SEC) presentaron un nivel de interacciones PMN-endotelio similar al de voluntarios sanos, sin diferencias significativas en la velocidad, rodamiento o adhesión con respecto a ellos. Además, en el caso de los pacientes tratados con ADA, estos presentaban un número significativamente menor de PMNs en fase rodamiento y una velocidad de rodamiento de estos significativamente mayor, en comparación con los pacientes que no habían recibido tratamiento (*naïve*). Ambos parámetros se traducen en una menor activación leucocitaria (**Figura 44**). Por otro lado, los PMNs de pacientes en terapia con un anti-IL-12/23 (UST) mostraron un nivel de interacción comparable al obtenido en pacientes *naïve*, con una velocidad de rodamiento significativamente menor a la de los sanos y un número de PMNs en rodamiento y adheridos mayores que en estos (**Figura 44**).

En cuanto a los PBMCs, no había diferencias con respecto a los sanos en ninguno de los 3 parámetros medidos en los pacientes tratados con ADA y SEC, mientras que el grupo tratado con UST mostraba mayor activación significativa con respecto a los sanos en 2 de los parámetros: mayor cantidad de PBMCs en rodamiento y mayor número de PBMCs adheridos al endotelio (**Figura 44**).

Además, se midieron las concentraciones de DD en el plasma de una muestra representativa de los pacientes incluidos en el estudio para descartar diferencias importantes de actividad trombótica y trombolítica subclínica²³⁰ que pudieran sesgar los resultados (**Tabla 10 en el anexo**).

Figura 44. Nivel de interacción leucocito-endotelio en pacientes psoriásicos en tratamiento crónico con adalimumab, secukinumab o ustekinumab. Las interacciones entre los PMNs (izquierda) o PBMCs (derecha) de pacientes con psoriasis con endoteliales de donantes sanos fueron analizadas usando una cámara paralela de flujo en un modelo in vitro en el que las condiciones del flujo mimetizan el flujo dinámico que se da *in vivo*. Dentro del grupo de pacientes distinguimos 2 cohortes: sin tratamiento sistémico (*naïve*) y los tratados con ADA, SEC o UST. Las imágenes se registraron en un solo campo de visión durante un período de 5 minutos durante el cual se determinaron (a) la velocidad de rodamiento, (b) el flujo de rodamiento y (c) la adhesión a la monocapa confluyente de células endoteliales. Resultados son expresados como mediana \pm EEM ($n = 10-13$). * $p < 0,05$, y ** $p < 0,01$ frente al grupo de voluntarios sanos (si la distribución es normal: t-test de Student no pareado de dos colas; si la distribución era no normal: test de Mann-Whitney de dos colas). ## $p < 0,01$ respecto al grupo de los *naïve* (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). ADA: adalimumab; PBMC: célula mononuclear de sangre periférica; PMN: célula polimorfonuclear; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab; VS: voluntarios sanos.

Los leucocitos de pacientes en tratamiento convencional con metotrexato presentaron un comportamiento similar al de ADA y SEC, manteniendo controlados los niveles de interacción leucocitaria al mismo nivel que en los sujetos sin psoriasis (**Figura 45**).

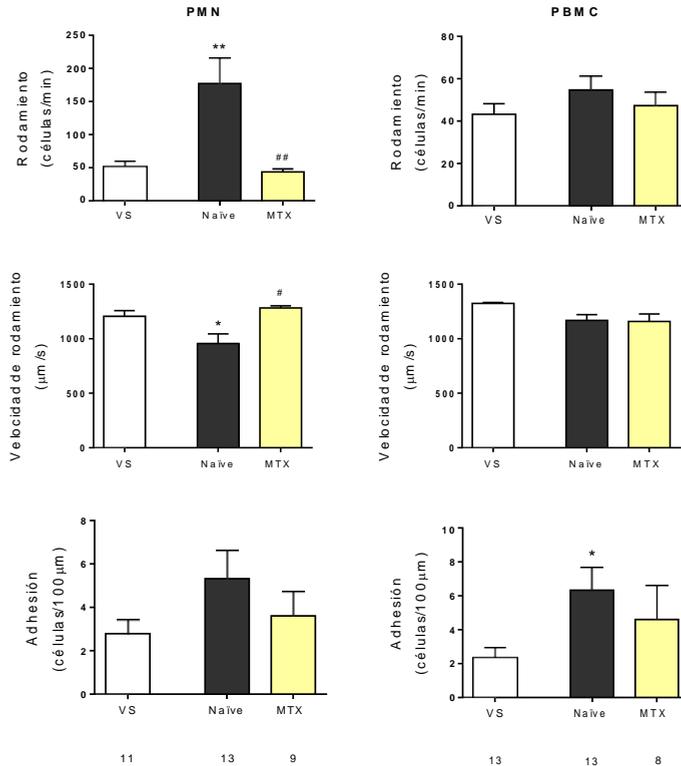


Figura 45. Nivel de interacción leucocito-endothelium en pacientes psoriásicos en tratamiento crónico con metotrexato. Las interacciones entre los PMNs (izquierda) o PBMCs (derecha) de pacientes con psoriasis y endoteliales de donantes sanos fueron analizadas usando una cámara paralela de flujo en un modelo *in vitro* en el que las condiciones del flujo mimetizan el flujo dinámico que se da *in vivo*. Dentro del grupo de pacientes distinguimos 2 cohortes: sin tratamiento sistémico (*naïve*) y los tratados con MTX. Las imágenes se registraron en un solo campo de visión durante un período de 5 minutos durante el cual se determinaron (a) la velocidad de rodamiento, (b) el flujo de rodamiento y (c) la adhesión a la monocapa confluyente de células endoteliales. Los resultados son expresados como mediana ± EEM (n = 8-13). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al grupo de voluntarios sanos (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto al grupo de los *naïve* (distribución no normal, test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). MTX, metotrexato; PBMC: célula mononuclear de sangre periférica; PMN: célula polimorfonuclear; VS: voluntarios sanos.

2.2.3. Diferencias en la interacción leucocito-endotelio antes y después del tratamiento con un fármaco biológico.

Los pacientes considerados *naïve* debutaron en el tratamiento el día de la inclusión al estudio, por lo que a este grupo se les realizó un seguimiento para la obtención de una segunda muestra con el fin de analizar los cambios a nivel de interacción leucocito-endotelio y expresión de las moléculas de adhesión tras la instauración del tratamiento. Se realizó el seguimiento completo de 9 pacientes.

Tras una media de 18 semanas desde el inicio del tratamiento continuado con un fármaco biológico, la cantidad de PMNs en rodamiento de los pacientes disminuyó de forma significativa con respecto al nivel de rodamiento antes del tratamiento (**Figura 46 A, Tabla 11 en el anexo**) y la velocidad de dicho rodamiento aumentó de forma significativa (**Figura 46 B, Tabla 12 en el anexo**). No se llegaron a apreciar cambios significativos con respecto a la adhesión (**Figura 46 C, Tabla 13 en el anexo**). De estos 9 pacientes, 6 habían recibido tratamiento con ADA y 3 con SEC.

En el caso de los PBMCs (seguimiento completo de 8 pacientes) los resultados siguen la misma línea que en PMNs. Tras controlar la clínica cutánea con un tratamiento biológico, también disminuyó la cantidad de PBMCs en rodamiento (**Figura 47 A, Tabla 14 en el anexo**) y aumentó su velocidad de rodamiento (**Figura 47 B, Tabla 15 en el anexo**), ambos parámetros de forma significativa. Ambos cambios suponen una disminución de la inflamación vascular en estos pacientes. No llegamos a apreciar cambios significativos con respecto a la adhesión (**Figura 47 C, Tabla 16 en el anexo**). De entre estos 8 pacientes, 5 habían recibido tratamiento con ADA y 3 con SEC.

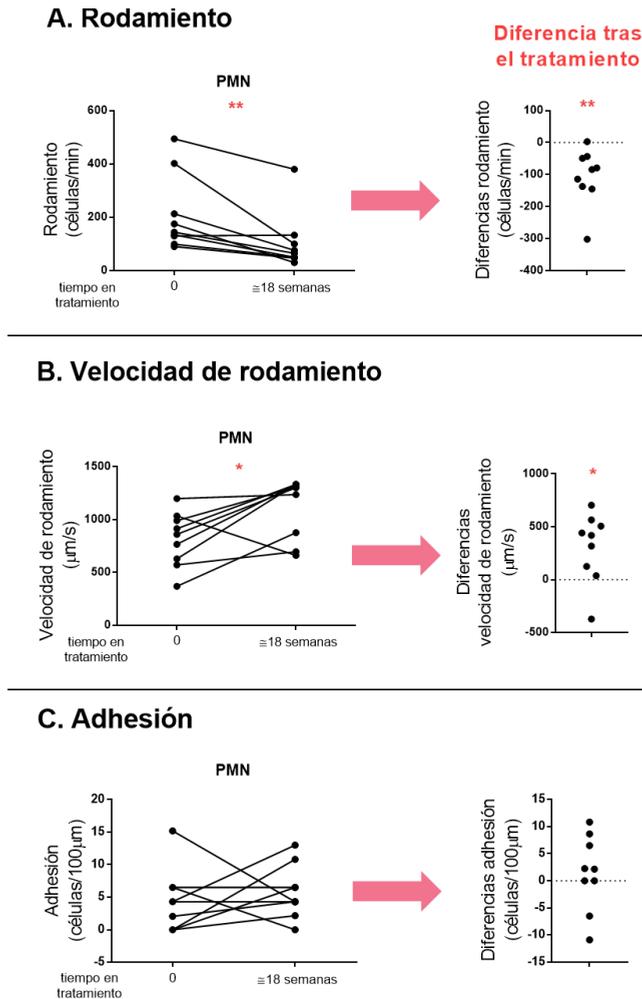
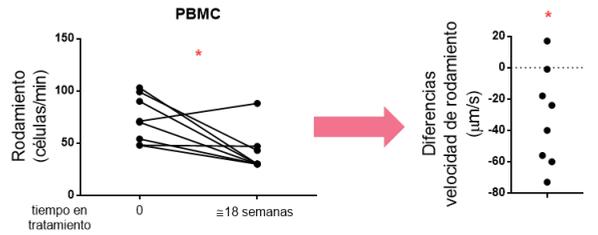
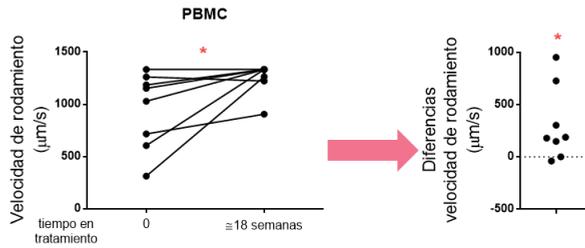


Figura 46. Comparación de los parámetros de interacción PMNs-endothelio antes y después del tratamiento con un fármaco biológico. Resultados expresados también en Tablas 11-13 del anexo. En aquellos pacientes *naïve* a los cual se les realizó una extracción justo antes de empezar el tratamiento sistémico (tiempo 0), se les realizó una segunda extracción tras una media de 18 semanas con el biológico pautado para analizar los cambios a nivel de interacción leucocito-endothelio. Las interacciones entre los PMNs de los pacientes y células endoteliales de donantes sanos fueron analizadas usando una cámara paralela de flujo. Las imágenes se registraron en un solo campo de visión durante un período de 5 minutos durante el cual se determinaron (A) el rodamiento, (B) la velocidad de rodamiento y (C) la adhesión a la monocapa confluyente de endoteliales. Los resultados son expresados como valores absolutos antes y después del tratamiento (izquierda) y como la diferencia de dichos valores (derecha) (n = 9). *p<0,05 y **p<0,01 respecto a la mediana del parámetro en los mismos sujetos a tiempo 0 (distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon). PMN: célula polimorfonuclear.

A. Rodamiento



B. Velocidad de rodamiento



C. Adhesión

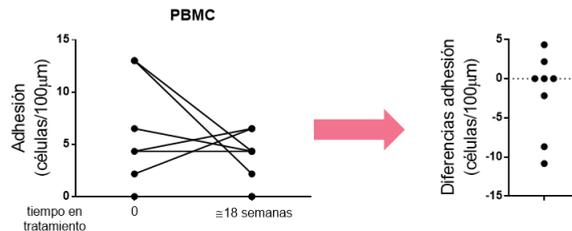


Figura 47. Comparación de los parámetros de interacción PBMCs-endotelio antes y después del tratamiento con un fármaco biológico. Resultados expresados también en tablas 14-16 del anexo. En aquellos pacientes *naïve* a los cual se les realizó una extracción justo antes de empezar el tratamiento sistémico (tiempo 0), se les realizó una segunda extracción tras una media de 18 semanas con el biológico pautado para analizar los cambios a nivel de interacción leucocito-endotelio. Las interacciones entre los PBMCs de los pacientes y células endoteliales de donantes sanos fueron analizadas usando una cámara paralela de flujo. Las imágenes se registraron en un solo campo de visión durante un período de 5 minutos durante el cual se determinaron **(A)** el rodamiento, **(B)** la velocidad de rodamiento y **(C)** la adhesión a la monocapa confluyente de células endoteliales. Los resultados son expresados como valores absolutos antes y después del tratamiento (izquierda) y como la diferencia de dichos valores (derecha) (n = 8). *p<0,05 frente a la mediana o media del parámetro en los mismos sujetos a tiempo 0 (distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon; distribución normal, t-test pareado paramétrico). PBMC: célula mononuclear de sangre periférica.

2.3. Implicación de los complejos leucocito-plaqueta en el desarrollo clínico y cardiovascular de la psoriasis.

2.3.1. Cantidad y caracterización de complejos plaqueta-leucocito en pacientes con psoriasis frente a la población sana.

El porcentaje de neutrófilos CD41+ (**Figura 48 A**) y monocitos CD41+ (**Figura 48 B**) en sangre entera de pacientes con psoriasis sin tratamiento sistémico (n = 15) es significativamente mayor que en voluntarios sanos; o lo que es lo mismo, en la sangre entera periférica de pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico hay más complejos leucocito-plaqueta/s que en la de la población general. La unión de las plaquetas a los leucocitos implica una mayor activación de ambos tipos celulares, incluyendo la inducción de la exposición de determinadas moléculas de adhesión²³¹. Se comprobó la presencia de una mayor expresión de CD18 en los neutrófilos unidos a plaquetas con respecto a los neutrófilos libres (**Figura 48**), tanto en pacientes como en individuos sanos.

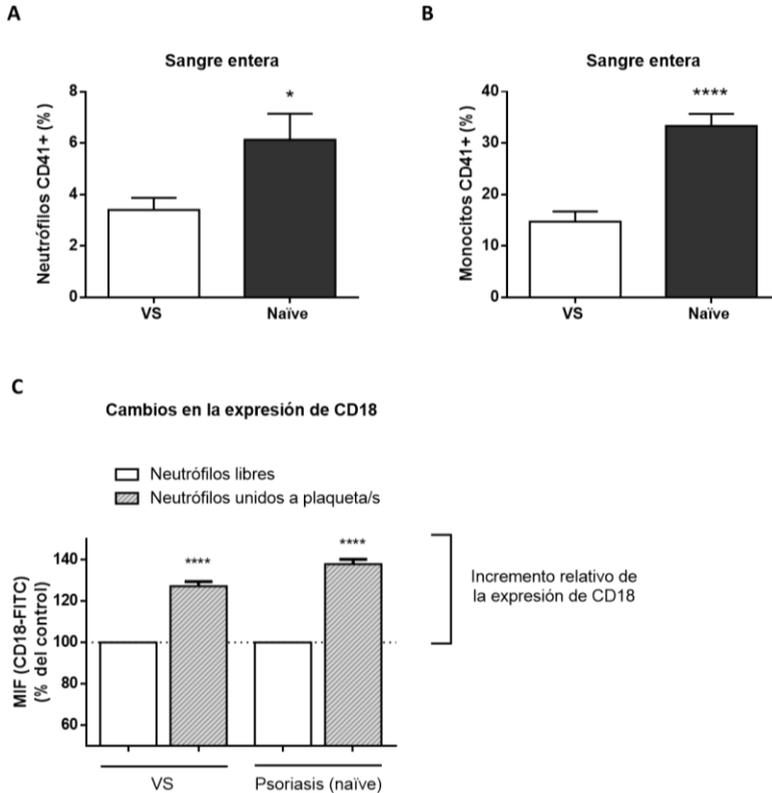


Figura 48. Complejos plaqueta-leucocito en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (naïve). Se cuantificó la expresión de CD41 en sangre entera de voluntarios sanos o de pacientes de psoriasis sin tratamiento sistémico. Las poblaciones leucocitarias se identificaron en función de sus características de tamaño y granulosidad (*forward scatter*-FSC- y *side scatter*-SSC-, respectivamente) y CD41 se detectó mediante el marcaje con CD41-PE. **A)** Porcentaje de complejos neutrófilo-plaqueta. Proporción de neutrófilos CD41+, ocupados por una o varias plaquetas. **B)** Porcentaje de complejos monocito-plaqueta. Proporción de monocitos CD41+, ocupados por una o varias plaquetas. Los resultados son expresados como mediana \pm EEM ($n = 15$). * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo de voluntarios sanos (cuando la distribución fue normal, t-test no pareado; cuando la distribución era no normal, test no paramétrico de Mann-Whitney). **C)** Diferencias en la activación (expresión de CD18) entre neutrófilos libres y neutrófilos unidos a plaqueta/s. Los valores representan el porcentaje de la media de intensidad de fluorescencia (MFI) respecto del control (MFI de CD18 en población de neutrófilos libres de ese mismo individuo, 100%). Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n = 10$). **** $p < 0,0001$ respecto a la población de neutrófilos libres (t-test no pareado). FITC: isotiocianato de fluoresceína; MFI: media de la intensidad de fluorescencia; PMC: complejo monocito-plaqueta; PNC: complejo neutrófilo-plaqueta; VS: voluntarios sanos.

Para evaluar si el aumento de la cantidad de PNC se acompaña de una mayor activación de los neutrófilos y/o de un incremento de la proporción de plaquetas por cada complejo se compararon los complejos plaqueta-neutrófilo presentes constitutivamente en voluntarios sanos o pacientes *naïve* con los formados por la estimulación con TNF α o ADP. TNF α o ADP estimulan la formación de PLC (**Figura 49 A-B**), pero generando perfiles diferentes: el ADP ejerce su efecto principalmente sobre las plaquetas, promoviendo su activación, por lo que aumenta significativamente la fluorescencia de CD41 en la población CD41+ (**Figura 49 D**), lo que indica una mayor proporción de plaquetas unidas a cada neutrófilo con respecto a los PNC basales en sangre, pero sin afectar de forma directa la expresión de CD18 (**Figura 49 F**); mientras que el efecto de TNF α sobre los propios leucocitos es mucho mayor, aumentando la expresión de CD18 (**Figura 49 F**), pero no produce cambios en la proporción de plaquetas/PNC porque no genera variaciones en fluorescencia de CD41 en la población CD41+ (**Figura 49 D**).

En los pacientes *naïve* observamos un aumento del número de PNC (**Figura 49 C**), acompañado de un aumento de la expresión de CD18 en los neutrófilos, **Figura 49 G**), pero sin cambios en la fluorescencia de CD41 en los neutrófilos CD41+ (**Figura 49 E**), es decir, sin aumentar la proporción de plaquetas por cada complejo, un perfil de PLC más parecido al generado por el TNF α que por el ADP.

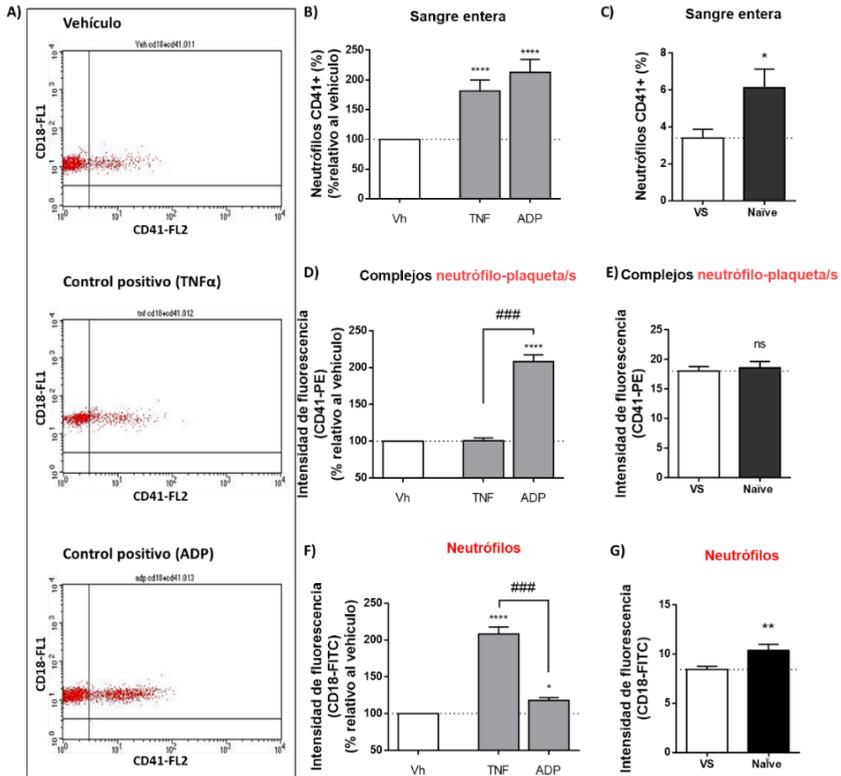


Figura 49. Caracterización de los complejos plaqueta-neutrófilo en pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (naïve). Se compararon los complejos plaqueta-neutrófilo presentes en sangre entera de voluntarios sanos o pacientes *naïve* ($n = 10-14$) con los formados por la estimulación con TNF α (25 ng/mL) o ADP (10 μ M) ($n = 15$). **A)** Diagramas representativos de los tratamientos de sangre entera con agua estéril (vehículo), TNF α o ADP, respectivamente. **B)** Porcentaje de PNC en sangre entera tratada con TNF α o ADP. **C)** Porcentaje de complejos neutrófilo-plaqueta en sangre entera de voluntarios sanos y pacientes *naïve*. **D)** Expresión de CD41 en los PNC como estimación de la proporción de plaquetas/complejo al tratar con TNF α o ADP. **E)** Expresión de CD41 en los PNC como estimación de la proporción de plaquetas/complejo en sangre entera de voluntarios sanos y pacientes *naïve*. **F)** Expresión de CD18 en neutrófilos de sangre entera tratada con TNF α o ADP. **G)** Expresión de CD18 en neutrófilos de voluntarios sanos y pacientes *naïve*. Los resultados del tratamiento *in vitro* con TNF α o ADP representan el porcentaje de la expresión respecto del control (vehículo, 100 %). * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$ respecto al vehículo y ### $p < 0,001$ respecto al TNF α o ADP (test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn). Los resultados en VS y son expresados como mediana \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo de voluntarios sanos (t-test no pareado). FITC: isotiocianato de fluoresceína; FL1: canal de FITC; FL2: canal de PE; ns: no significativo; PE: ficoeritrina; PMC: complejo monocito-plaqueta; PNC: complejo neutrófilo-plaqueta; Vh: vehículo; VS: voluntarios sanos.

2.3.2. Relación entre los PLC y evolución de la clínica cutánea en pacientes de psoriasis naïve.

Según nuestros datos, no parece haber relación entre el porcentaje de PLC y la severidad de la enfermedad puesto que dicho porcentaje no se relaciona con el DLQI (Figura 50), ni con el PASI (Figura 50).

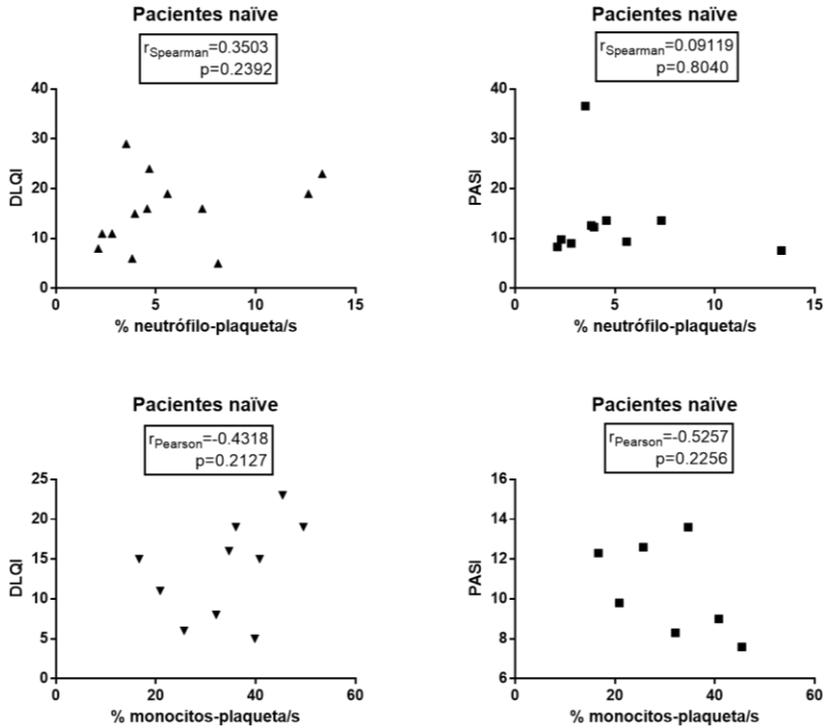


Figura 50. Relación entre los marcadores de gravedad de la psoriasis, DLQI y PASI, y el porcentaje de complejos plaqueta-neutrófilo (arriba) o plaqueta-monocito (abajo). (n = 7-12). El valor de r fue determinado mediante el coeficiente de correlación de Pearson si la población era paramétrica o de Spearman si no lo era, $p < 0.05$ sería considerado significativo. DLQI: índice de calidad de vida dermatológico; PASI: área e índice de gravedad de la psoriasis.

2.3.3. Relación entre los PLC y la inflamación vascular en pacientes de psoriasis naïve.

Nos centramos en los PNC, ya que los principales cambios fenotípicos y funcionales que hemos encontrado ha sido en los neutrófilos. En los pacientes *naïve* la correlación lineal entre el porcentaje de PNC y el número de neutrófilos en rodamiento sobre el endotelio fue positiva, en una muestra de 10 pacientes, de modo que ambas variables están asociadas en sentido directo (**Figura 51**).

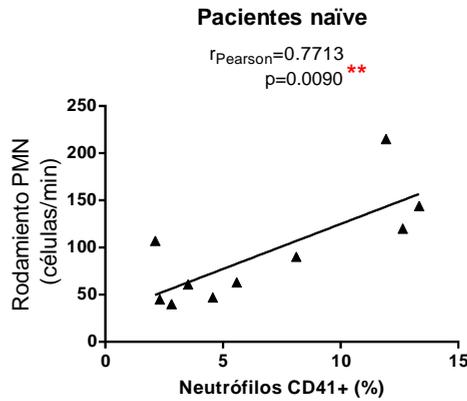


Figura 51. Relación entre la cantidad de neutrófilos en fase de rodamiento y el porcentaje de complejos plaqueta-neutrófilo en pacientes *naïve*. (n = 10). La correlación entre el porcentaje de complejos neutrófilo-plaqueta y el número de neutrófilos en rodamiento sobre el endotelio fue positiva en pacientes *naïve*. El valor de r fue determinado mediante el coeficiente de correlación de Pearson, $p < 0.05$ sería considerado significativo. PMN: polimorfonuclear.



Discusión

A lo largo de los últimos años se ha hecho evidente la existencia de una relación entre la psoriasis moderada-severa y el riesgo aumentado de sufrir ECVs. La mayoría de los estudios consideran esta patología un factor de riesgo cardiovascular independiente de los factores de riesgo tradicionales^{11,44-47,57-59,86}, aunque esto es algo que está aún por determinar¹. Se considera la condición inflamatoria como enlace base entre la afección cutánea y la vascular^{23,89,90,120}. Nuestros resultados demuestran que la psoriasis coexiste con la presencia de leucocitos circulantes activados, lo cual es señal de inflamación vascular, y que las principales terapias biológicas –que son eficaces para combatir las manifestaciones cutáneas de la enfermedad– no son igualmente eficaces para controlar dicho entorno inflamatorio vascular. Basamos esta afirmación en la evidencia obtenida tanto de datos humanos como de animales.

Para corroborar la asociación entre psoriasis y comorbilidad vascular pusimos a punto un modelo de psoriasis en ratón por aplicación tópica de IMQ con el objetivo de generar un entorno *in vivo* que permitiera que todas las células del sistema vascular del animal, y en particular leucocitos y endotelio, estuvieran expuestas a la condición inflamatoria sistémica que se asocia a esta enfermedad, y así poder valorar mediante microscopía intravital si la formación de las lesiones cutáneas venía acompañada de afectación vascular. En estas condiciones, pudimos detectar un marcado incremento de la interacción leucocito-endotelio (velocidad de rodamiento y adhesión leucocitarias), que supone un signo distintivo de disfunción e inflamación vascular⁻⁹³.

La inflamación vascular representa una expresión temprana y crucial de la formación de la placa aterosclerótica precedente a la generación de eventos cardiovasculares⁹³. Además, es bien conocido que

DISCUSIÓN

el reclutamiento de leucocitos por el endotelio está implicado en la formación de trombos⁹³, siendo la trombosis la patología subyacente común al desarrollo de las principales ECVs responsables de muerte-infarto de miocardio, ictus tromboembólico y tromboembolia venosa⁻⁹³. Determinamos si la inflamación vascular detectada era realmente capaz de predisponer a los ratones a sufrir un evento trombótico, como marcador final de daño vascular, empleando el modelo murino de trombosis inducida por FeCl₃, probablemente el enfoque experimental más utilizado para analizar la formación de trombos. Este modelo implica una combinación de daño oxidativo y endotelial junto con un efecto fisicoquímico²³², y ha sido una técnica importante para dilucidar el papel de los receptores plaquetarios, ligandos, vías de activación, y para determinar la implicación de las proteasas de la coagulación en la regulación de la generación de trombina y formación de trombos²³². Desde un punto de vista más farmacológico, ha sido empleado para evaluar la influencia de numerosos fármacos en este proceso^{218,233}, desde inhibidores de la agregación plaquetaria (como aspirina, clopidogrel o ticagrelor)²³⁴ hasta anticoagulantes^{235,236}. El hallazgo de que las arteriolas de los ratones con psoriasis inducida por IMQ se ocluyen rápidamente cuando se exponen a concentraciones de FeCl₃ que carecen de efectos sobre las arteriolas cremastéricas de animales sanos nos confirma, en un modelo murino cutáneo reproducible, la asociación entre psoriasis y la existencia de inflamación vascular capaz de producir daño vascular y generar un entorno protrombótico. Este es un hallazgo que también se sospecha en pacientes psoriásicos^{122,237} y que está en línea con los estudios clínicos que apuntan a una asociación entre la psoriasis severa y un mayor riesgo cardiovascular^{11,44-47,58,59}.

Abordamos un enfoque traslacional en la investigación con el fin de valorar el alcance clínico de estos resultados, evaluando la interacción

leucocito-endotelio en pacientes con psoriasis moderada-grave. No podemos acceder de forma directa al entorno vascular de los pacientes *in vivo* para adquirir muestra de sus células endoteliales, pero sí a sus leucocitos, por lo que analizamos el estado de activación de los leucocitos de los pacientes, tanto funcionalmente mediante ensayos de adhesión en cámara paralela de flujo (en los que evaluamos el número de células en fase de rodamiento, la velocidad de rodamiento, y la adhesión), como fenotípicamente caracterizando el perfil de moléculas de adhesión leucocitarias. Observamos que los neutrófilos de pacientes con psoriasis moderada a grave sin tratamiento sistémico (*naïve*) exhiben un mayor nivel de interacción leucocito-endotelio que, de acuerdo a los datos obtenidos del análisis de la expresión de moléculas de adhesión, podría atribuirse al aumento de la expresión de las integrinas β_2 Mac-1 (CD18/CD11b) y CR4 (CD18/CD11c) en su conformación activa. En la población de monocitos los pacientes no presentaban cambios significativos en la expresión de ninguna de las moléculas analizadas, lo cual coincide con el hecho de que no hubiera cambios en los parámetros de rodamiento de PBMCs y velocidad de rodamiento. Sin embargo, sí observamos un incremento en la adhesión, que podría explicarse con la tendencia a la activación de CD62L (L-selectina) y en CD49d (integrina β_1 VLA-4) que, aun no siendo significativa, su sinergia podría dar lugar a un perfil de moléculas de adhesión suficientes para motivar la adhesión de algunos PBMCs al endotelio.

A la vista de nuestros resultados, los mayores cambios, tanto funcionales como proteicos, apuntan a los neutrófilos como protagonistas de la inflamación vascular vinculada a la psoriasis, cuya activación es consistente con la presencia de un entorno inflamatorio vascular en los pacientes con psoriasis y coherente con lo visto en el modelo animal. Precisamente los neutrófilos son uno de los principales tipos celulares

DISCUSIÓN

implicados en el desarrollo crónico de la psoriasis^{25,57}: su función, fenotipo, la activación y la cantidad de neutrófilos se encuentran alterados en estos pacientes²⁷ y su actividad tras la estimulación por la IL-17A juega un papel fundamental en la perpetuación de la inflamación²⁷. Aunque el rol de los distintos tipos de células sanguíneas en la comorbilidad cardiovascular de los pacientes psoriásicos no ha sido claramente evidenciado, monocitos y neutrófilos son relevantes en el desarrollo tanto de psoriasis^{27,38,109}, como de aterosclerosis y diversas afecciones vasculares¹¹¹, y su actividad en ambas podría convertirlos en potenciales nexos entre ambas afecciones^{57,104}.

Un inconveniente del enfoque funcional en cámara de adhesión *in vitro* es que solo uno de los tipos celulares involucrados -los leucocitos, en este caso- provienen de pacientes con psoriasis, mientras que las células endoteliales se obtienen de donantes sanos no sometidos al mismo ambiente inflamatorio que los leucocitos. Sin embargo, el hecho de que con solo uno de los tipos celulares sometido al entorno inflamatorio propiciado por la psoriasis ya se observe un incremento significativo de la interacción leucocito-endotelio indica que en el sistema vascular de los pacientes debe existir un nivel sustancial de interacción.

El papel que desempeñan los fármacos biológicos, dirigidos frente a citocinas inflamatorias específicas, en estos procesos de daño vascular sigue siendo controvertido, probablemente debido a la inconsistencia de los datos clínicos sobre su eficacia frente al aumento del riesgo cardiovascular. Lebwohl (2017) citó la falta de una tecnología suficientemente específica y sensible como uno de los motivos para esta inconsistencia²³⁸. Sin embargo, nuestro abordaje experimental implica una medida muy precisa de la afectación vascular y nos permite visualizar las interacciones iniciales entre leucocitos y células endoteliales. De esta

manera, pudimos determinar en el modelo animal que las concentraciones clínicas de fármacos anti-TNF α y anti-IL17 evitan el reclutamiento de leucocitos por parte del endotelio y protegen de la inducción de la trombosis, no siendo así al administrar el fármaco anti-IL12/23. Efecto que pudimos apreciar con la administración de una sola dosis de los fármacos, e independiente de lo que lograban a nivel cutáneo, puesto que con esa administración única ninguno de ellos actuó sobre la acantosis dérmica instaurada. El escenario en las muestras con pacientes fue similar: el bloqueo de las citocinas TNF α (pacientes tratados con ADA) o IL-17A (pacientes tratados con SEC) controla, no sólo las manifestaciones cutáneas –ya que en este caso, en tratamiento crónico, si mantenían en remisión la clínica cutánea-, sino también la inflamación vascular a través del control de la expresión del perfil de moléculas de adhesión, principalmente Mac-1 y CR4; mientras que el bloqueo de IL12/23 (en pacientes tratados con UST), a pesar de mantener en remisión la clínica cutánea, no disminuye ninguno de los parámetros de inflamación vascular medidos. Además, al completar el seguimiento de 18 semanas de tratamiento con un fármaco biológico en 10 de los pacientes *naïve*, pudimos comprobar como el tratamiento biológico normalizaba tanto el parámetro de rodamiento como la velocidad de rodamiento de forma estadísticamente significativa en el análisis por pares, lo cual refuerza la idea de que realmente la atenuación de la afectación vascular se debe al tratamiento, y no a otros factores o variables, ya que cada individuo es su propio control. La continuación de este estudio con una muestra de pacientes mucho más elevada, podría arrojar más luz sobre la significatividad clínica de estos resultados, así como la existencia de diferencias entre los distintos tratamientos.

En compendio, nuestros resultados demuestran que la psoriasis coexiste con un estado de inflamación vascular, que conduciría a un

mayor riesgo de eventos cardiovasculares como la trombosis, y respaldan la idea de que el tratamiento de la psoriasis con algunos de los fármacos biológicos prescritos actualmente, en concreto fármacos anti-TNF α y anti-IL17, pero no los anti-IL-12/23, podría ejercer un impacto positivo sobre dichas manifestaciones inflamatorias vasculares. Estos datos están alineados con muchos de los estudios clínicos publicados recientemente. Los beneficios cardioprotectores de los anti-TNF α se documentaron por primera vez en pacientes con artritis reumatoide, donde se asociaron con una mejoría en la función endotelial²³⁹ y con una reducción de todos los ECVs^{210,240}. La participación ubicua del TNF α en una amplia variedad de respuestas vasculares inflamatorias y su aparición temprana en la cascada patogénica, han motivado a considerar la terapia anti-TNF α como la más prometedora para controlar la comorbilidad cardiovascular⁷⁴. El bloqueo de esta citocina disminuye la diferenciación de linfocitos T a Th1, Th17 y Th22, la posterior liberación de IL-17 A, IL-17F e IL-22 y los niveles de reactantes de fase aguda como la PCR y el factor de crecimiento vascular⁷⁴. Grandes cohortes de pacientes tratados con anti-TNF han mostrado una reducción en el riesgo de sufrir eventos cardíacos adversos graves^{203,241} y, a pesar de que adalimumab e infliximab están contraindicados en pacientes con insuficiencia cardíaca moderada-grave debido a varios informes de casos contradictorios¹⁰, en pacientes con psoriasis y en los de artritis reumatoide mejoran la función endotelial²⁴² y reducen el riesgo de infarto de miocardio²⁴¹. Sin embargo, la evidencia en psoriasis sigue siendo escasa y, en general, hay poca demostración de su influencia positiva sobre los accidentes cerebrovasculares y otros MACEs²⁰³, además de estudios, como el de Bissonnette y colaboradores (2017), que no informaron una reducción significativa de la inflamación vascular en pacientes tratados con adalimumab^{243,244}. Uno de los últimos estudios centrados en el efecto de adalimumab sobre la inflamación

vascular y los biomarcadores cardiovasculares confirmó que redujo los marcadores clave de inflamación en comparación con la fototerapia, pero sin efectos sobre el metabolismo de la glucosa y la inflamación vascular, ni sobre los posibles efectos adversos asociados a las lipoproteínas de alta densidad²⁴⁵. De modo que, aunque la literatura sigue siendo heterogénea, en parte debido a diferencias metodológicas, los agentes anti-TNF α han mostrado ejercer efectos beneficiosos a nivel cardiovascular y comienzan a considerarse como los agentes sistémicos preferidos para el tratamiento de la psoriasis en pacientes con factores de riesgo cardiovascular coexistentes²⁴⁴, aunque siguen sin conocerse sus mecanismos de actuación sobre la inflamación vascular. Una revisión sistemática reciente no mostró un efecto significativo de los inhibidores de TNF- α en los indicadores subclínicos de aterosclerosis en psoriasis, pero no descartaron un efecto positivo sobre la clínica de las enfermedades cardiovasculares a través de otras vías, como la remisión de la enfermedad primaria o la reducción de la tendencia protrombótica²⁴⁶. Nuestras observaciones con este grupo de fármacos respaldan sus efectos positivos y muestran que el mecanismo de actuación podría estar relacionado con el efecto de estos fármacos sobre las moléculas de adhesión, la activación leucocitaria y, por lo tanto, sobre la inflamación vascular.

Menos esperados eran los prometedores resultados a nivel cardiovascular que se están documentando, cada vez más, con la terapia anti-IL17A²⁴⁷. Se ha descrito que esta citocina puede ejercer efectos proaterogénicos²⁴⁷, inflamatorios, protrombóticos, desestabilizadores de placa y atrayentes de células²⁴⁸, y estar relacionada con enfermedad coronaria^{249,250}; incluso se observó que su inhibición en ratones reduce significativamente el tamaño de las placas ateroscleróticas²⁴⁸. Sin embargo, su papel en la aterosclerosis sigue siendo controvertido ya que,

DISCUSIÓN

dependiendo del tejido, los tipos celulares implicados y el contexto inmunológico, también se le atribuyen acciones antiaterogénicas^{247,251} y se relaciona su presencia sérica con un menor riesgo de eventos cardiovasculares importantes^{247,252}. Estas diferencias pueden explicarse, al menos parcialmente, por las diferencias en el diseño del estudio, el método utilizado para inhibir la IL-17A, el modelo animal y el sitio de la lesión aterosclerótica, y están aun por esclarecerse²⁴⁷. Por otro lado, existen datos experimentales que sugieren que esta citocina podría desempeñar un papel central en la relación entre psoriasis y enfermedad cardiovascular²⁴⁷, pero los datos existentes que evalúan los efectos de los inhibidores de IL-17 sobre el riesgo de ECV en pacientes con psoriasis son insuficientes²⁰³. El papel protagonista de los neutrófilos en la inflamación vascular asociada a la psoriasis, evidenciado por nuestros datos, también puede vincularse con la relevancia de esta citocina en dicho proceso, ya que los neutrófilos son la principal fuente de IL-17A en las lesiones cutáneas psoriásicas²⁷. De hecho, uno de los efectos terapéuticos tempranos del tratamiento de la psoriasis con el anticuerpo anti-IL17A secukinumab es la eliminación casi total de los neutrófilos positivos para IL-17 intraepidérmicos²⁵. Nuestros resultados evidencian cómo el bloqueo de IL17A con el agente biológico secukinumab muestra una clara mejora en la inflamación vascular, tanto en animales como en pacientes, y una significativa disminución del entorno protrombótico en animales con psoriasis, lo cual apoya la hipótesis de que esta citocina tiene un papel destacable en el sistema vascular y que es una de las claves del desarrollo de ECV a partir de la psoriasis. En la misma línea van los resultados recientes del estudio CARIMA (del inglés *Evaluation of Cardiovascular Risk Markers in Psoriasis Patients Treated with Secukinumab*), el cual evaluó los marcadores de riesgo cardiovascular en pacientes con psoriasis en placas de moderada a grave tratados con

secukinumab durante 1 año, y demostró que este tratamiento puede resultar en una mejora de la función endotelial a las 52 semanas sin cambios proaterogénicos en la pared de los vasos o alteraciones en los biomarcadores cardiovasculares²⁵³. A pesar de que en un ensayo clínico reciente SEC mostró un impacto neutral a nivel de inflamación vascular²⁵⁴, los análisis apoyan la idea de que este tratamiento inflamatorio reduce la repercusión cardiovascular de la inflamación²⁵⁵. En cuanto a otros anti-IL17, no se ha demostrado que el ixekizumab ni brodalumab tenga un efecto sustancial en la reducción de parámetros con impacto cardiovascular⁸⁶.

Los agentes anti-IL12/23 son los que más dudas suscitan en lo que a la repercusión cardiovascular se refiere, pues, aunque IL-12 e IL-23 se han sugerido como factores potenciales proaterogénicos^{74,256,257} y, por lo tanto, su inhibición podría conferir cierta protección vascular, en la mayoría de los estudios clínicos los datos con ustekinumab sugieren un perfil neutral sobre los eventos cardiovasculares^{239,258}. Los ensayos clínicos iniciales con briakinumab mostraron un mayor número de eventos cardiovasculares^{259,260}, lo que motivó a vigilar los factores de riesgo cardiovascular en los pacientes en los que se iniciaba un tratamiento dermatológico con cualquier fármaco perteneciente a los anti-IL12/23²⁶¹, pero posteriormente, en ensayos más avanzados, no se encontraron diferencias significativas en el número de MACE en los individuos tratados con este tipo de biológicos en comparación con el grupo de placebo²⁶². Un estudio reciente de casos y controles también identificó una asociación significativa entre el inicio del tratamiento con ustekinumab y la aparición temprana de eventos cardiovasculares graves (OR: 4,17; IC del 95 %: 1,19-14,59)²⁶³. Sin embargo, de nuevo en estudios de farmacovigilancia a más largo plazo no se ha asociado su uso con tal aumento de riesgo^{262,264,265}. Con respecto a la inflamación sistémica, no

DISCUSIÓN

se ha observado que ustekinumab logre reducirla²⁶⁶ e incluso algunos estudios y metaanálisis han concluido que, si bien es cierto que disminuye la inflamación en hígado, bazo y aorta en pacientes con mejoría de las lesiones cutáneas, podría aumentar el riesgo de MACEs^{86,203}. Por contra, también hay hallazgos de que ustekinumab mostró una mejoría mayor en la función vascular, coronaria y miocárdica²⁰³. La mayoría de datos en la bibliografía apuntan a que los anti-IL12/23 tienen un perfil neutral sobre el desarrollo de eventos y parámetros cardiovasculares, pero no establecen conclusiones definitivas al respecto. Nuestros hallazgos apoyan que el bloqueo de IL12/23 no estaría involucrado en la mejora cardiovascular de los pacientes con psoriasis moderada-grave.

En cuanto a lo que ocurre con las terapias sistémicas convencionales, según la bibliografía, pueden agravar diferentes factores del síndrome metabólico²⁶⁷. No obstante, con el tratamiento con MTX se ha descrito una asociación beneficiosa sobre el riesgo cardiovascular^{241,268-271}; diferentes estudios le atribuyen efectos protectores a nivel vascular: mejora de la función endotelial equiparable a la obtenida con los anti-TNF α ²⁴¹, reducción de lipoproteína A y de los niveles séricos de E-selectina, control del endurecimiento arterial y prevención de la elevación de la presión arterial sistólica²⁷⁰. Con todo ello también se le ha atribuido una reducción de un 21% de riesgo cardiovascular, un 18 % del riesgo de infarto de miocardio y una relación inversa con el accidente cerebrovascular²⁷⁰. Ninguno de los datos anteriores procede de pacientes psoriásicos, sino de otras enfermedades inflamatorias inmunomediadas, fundamentalmente artritis reumatoide. Son pocos los estudios que han evaluado el impacto de MTX sobre el riesgo cardiovascular en pacientes con psoriasis o artritis psoriásica²⁷¹. En psoriasis, lo que se ha observado con el uso de MTX es una influencia limitada en la función plaquetaria, la resistencia a la insulina y los niveles

de lípidos, y cambios significativos en biomarcadores inflamatorios como PCR, TNF- α o IL-6²⁷⁰. Se han realizado estudios en pacientes con artritis reumatoide y psoriasis en placa concomitantes, en los que el grosor de la íntima-carótida-media y el grosor de la íntima-media femoral se redujeron al someterse a MTX en comparación con los pacientes a los que se les prescribió otro inmunosupresor convencional o un biológico⁸⁶, pero la evidencia que respalda su efecto vascular protector en poblaciones con psoriasis y artritis psoriásica aún no es concluyente²⁷¹.

En nuestros estudios incluimos MTX como representante por excelencia de la terapia clásica. Este tratamiento fue la única excepción al régimen de dosis única en el modelo murino, añadiendo en su caso un segundo grupo de administración múltiple durante 6 días, puesto que consideramos que su mecanismo de acción en psoriasis, al no estar del todo esclarecido^{163,164}, puede incluir rutas de síntesis menos directas que el bloqueo de citocinas con un anticuerpo monoclonal. La dosis única no tuvo efecto sobre ninguno de los parámetros: se mantuvo la acantosis, el aumento de masa esplénica, el aumento de adhesión leucocitaria y la tendencia a trombo, igual que en el grupo de animales sin tratamiento. Al igual que UST, la dosis única de MTX no ejerce ningún efecto vasculoprotector. Sin embargo, los resultados con el tratamiento continuado de 6 días fueron confusos porque no influyó en la acantosis, pero sí evitó el aumento de la masa esplénica característico del modelo, lo cual nos hace pensar que el uso concomitante del fármaco con la administración tópica de IMQ impidió que la psoriasis se indujera completamente, afectándose la piel del animal, pero no desarrollándose la afección sistémica, por lo que no es posible extraer conclusiones sobre el efecto cardiovascular de MTX en el modelo murino con este protocolo experimental. Sería necesario repetir un protocolo específico para el

tratamiento con MTX que permitiera adaptarse a su posible mecanismo más tardío, sin repercutir en la instauración de la psoriasis.

El estudio de la interacción leucocito-endotelio en pacientes en tratamiento crónico MTX no se ve afectado por las limitaciones que encontrábamos en el modelo animal. En pacientes, el tratamiento convencional con MTX logra mantener controlada la interacción leucocito-endotelio, pero, a diferencia de ADA y SEC, lo hace sin afectar a la expresión de las moléculas de adhesión, lo cual nos indica que el cambio que induce MTX es a nivel de la activación de estas, no de su expresión. Las integrinas leucocitarias se pueden encontrar en estado activo (con alta afinidad por sus ligandos) o inactivo, sin necesidad de cambiar la densidad de su expresión^{272,273}, de modo que, un aumento en su expresión no implica necesariamente la inducción de la interacción con el endotelio; ni, al contrario, que no haya aumento no nos asegura que no haya mayor interacción. Los pacientes en tratamiento continuado con MTX muestran un perfil de moléculas de adhesión funcionalmente inactivas a nivel de interacción con el endotelio. El mecanismo antiinflamatorio completo de MTX aún está en proceso de esclarecerse, pero publicaciones recientes sugieren que podría estar relacionado con el aumento de las concentraciones de adenosina¹⁶³⁻¹⁶⁵, la cual disminuye la activación desmedida de los Th y restaura significativamente la función inmunosupresora de Tregs¹⁶³⁻¹⁶⁵. La unión de la adenosina a su receptor A_{2a} y A_{2b} en neutrófilos inhibe la adhesión de estos a las células endoteliales^{163-165,274}, especialmente actuando sobre la modulación de las selectinas, pero sin efecto sobre su expresión en la superficie de las moléculas²⁷⁴. Se cree que esto podría deberse a que la adenosina altera las interacciones entre las moléculas de adhesión y el citoesqueleto de los neutrófilos, alterando su capacidad de adhesión²⁷⁴. Este mecanismo antiinflamatorio a través de la adenosina podría explicar los efectos

observados en los pacientes tratados con MTX: una inhibición funcional de la interacción de los neutrófilos con el endotelio, sin afectar a la expresión proteica de las moléculas de adhesión leucocitarias, pero sí a su actividad. El estudio de Reiss y colaboradores en 2005 ya relacionó este posible mecanismo de MTX con un efecto ateroprotector: demostraron que mediante la activación del receptor de adenosina A2A, el MTX promueve el transporte inverso del colesterol y limita la formación de células espumosas en los macrófagos²⁷⁵. Nuestros resultados demuestran otro efecto protector vascular de MTX relacionado con el mecanismo que involucra a la adenosina.

Todos los resultados presentados en esta tesis otorgan a la activación leucocitaria un rol protagonista en la inflamación vascular asociada a la psoriasis. Los leucocitos activados tienen la capacidad de inducir la activación de las plaquetas²³¹, estas también cuentan con un papel importante en el desarrollo de la psoriasis¹¹⁴ y de sus posibles complicaciones vasculares a largo plazo¹¹⁴. Los pacientes psoriásicos presentan más cantidad de marcadores de activación plaquetaria^{114,115} que la población general. La activación de plaquetas está asociada con su posterior desgranulación y la formación de complejos plaqueta-leucocito (PLC)²²⁶, los cuales se consideran marcadores de activación plaquetaria, más sensibles incluso que la expresión de P-selectina de superficie²²⁶. Los estudios *in vivo* muestran que los leucocitos y las plaquetas se colocalizan dentro de las lesiones ateroscleróticas, en los sitios de hemorragia y lesión por isquemia-reperfusión²³¹. De hecho, se encuentran niveles elevados de PLC en pacientes con diabetes, síndromes coronarios agudos, traumatismos y sepsis^{226,231}. En psoriasis también se ha corroborado una mayor presencia de estos agregados^{114,276}, pero su relevancia sigue siendo desconocida, aunque consideramos que su formación podría ser un potencial nexo de unión entre las enfermedades inflamatorias crónica y

DISCUSIÓN

la comorbilidad cardiovascular, puesto que son varias las publicaciones que relacionan estos agregados con inflamación, aterosclerosis y problemas cardiovasculares^{114,226,231,277}, e incluso los presentan como un predictor independiente de eventos aterotrombóticos²³¹.

Acorde a lo expuesto anteriormente, los pacientes psoriásicos *naïve* incluidos en nuestro estudio presentaron mayor porcentaje de PLC (tanto de monocitos como de neutrófilos) que los individuos sanos. La unión de las plaquetas a los leucocitos implica una mayor activación inicial de ambos tipos celulares, mayor exposición de determinadas moléculas de adhesión y receptores de superficie, facilita e incrementa el reclutamiento y la extravasación de leucocitos desde los vasos sanguíneos, promueve la liberación de mediadores proinflamatorios leucocitarios, el estallido oxidativo, la fagocitosis y la liberación de vesículas extracelulares de neutrófilos^{114,226,231,277}. De hecho, hemos corroborado que los neutrófilos que forman parte de un complejo con plaquetas son fenotípicamente y funcionalmente distintos a los leucocitos libres, representando un subconjunto de células más activado, con un patrón de adhesión mayor al de los leucocitos libres^{231,276}. De manera que la unión de las plaquetas a los leucocitos, y por tanto la mayor presencia de PLC, podría ser uno de los factores contribuyentes al estado de activación de los leucocitos en los pacientes *naïve* con psoriasis moderada-severa. En la población de pacientes *naïve* seleccionada los PNC presentaban un perfil similar al generado por la estimulación con TNF α , en el que la activación leucocitaria prima sobre la plaquetaria en dicho complejo (en contraposición al perfil generado por estimulación por ADP, cuya activación fundamental es a nivel de plaquetas), dato que reafirma el papel fundamental de la citocina TNF α en el desarrollo de la psoriasis y señala al neutrófilo como tipo celular protagonista tanto de la patología en sí como de la relación entre esta y la comorbilidad vascular.

Se ha hallado correlación entre marcadores de activación plaquetaria y la gravedad de la psoriasis¹¹⁴, pero no se conoce la implicación de los PLC en la severidad de la patología. Según la bibliografía, la unión de las plaquetas a los leucocitos facilita e incrementa el reclutamiento y la extravasación de estos desde los vasos sanguíneos^{114,226,231,277}. En nuestros pacientes *naïve*, encontramos que el porcentaje de PNC es independiente del estado cutáneo de la psoriasis (entendido como PASI), pero sí guarda una relación directa con el número de neutrófilos provenientes de estos pacientes que entran en fase de rodamiento sobre un endotelio sano. Esto reafirma que el aumento de PNC en la psoriasis moderada-severa es uno de los factores que promueve la interacción de los neutrófilos con la pared vascular. Debería considerarse la medida de la cantidad de PLC como potencial parámetro clínico para evaluar la vulnerabilidad vascular de los pacientes con psoriasis moderada-grave y valorar la posible utilidad de terapias que previenen las interacciones plaqueta-neutrófilo en pacientes con psoriasis cardiovascularmente vulnerables.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la psoriasis coexiste con un estado de inflamación vascular compatible con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares, en el que los neutrófilos circulantes son el principal tipo celular involucrado, y que las principales terapias biológicas -que son efectivas frente a las manifestaciones cutáneas de la enfermedad- no son igualmente eficaces en el control de dicho entorno inflamatorio vascular, lo que podría suponer una razón de peso para replantear la posición de estos fármacos en el algoritmo general de tratamiento de la psoriasis de moderada a grave. Así, los fármacos anti-TNF α y anti-IL17 podrían ser los más aventajados en este sentido, ya que muchos de los estudios con ADA y SEC hablan de reducción de todos los ECVs de forma general y apuntan, al igual que nuestros resultados, a que sus efectos se remontan a las etapas más tempranas de la inflamación

DISCUSIÓN

vascular^{210,240,253,255}. Además, los anti-TNF α y los anti-IL17 han demostrado ampliamente mayor tolerabilidad y menos efectos secundarios que los tratamientos convencionales^{10,182}. Cada vez son más los hallazgos de que la mejor evidencia de mejora cardiovascular en los últimos años es responsabilidad de los anti-IL-17²⁴⁷. Sin embargo, faltan estudios controlados que aborden esto. El nuestro otorga más argumentos a favor de esta evidencia. Al potencial efecto vasculoprotector de los anti-IL17 hay que añadir que este grupo farmacológico ha mejorado significativamente la resolución de la psoriasis, siendo más eficaz en el aclaramiento de la psoriasis no solo frente a las terapias convencionales, sino también frente a otros biológicos, según la última revisión sistemática publicada en la base de datos Cochrane¹⁸¹. Además, secukinumab es eficaz para variantes resistentes de psoriasis, su acción es más rápida que con la mayoría de alternativas^{179,191-194} y consiguen mantener la respuesta incluso un año después de la cesión del fármaco^{179,191,192}. En el caso de MTX, los hallazgos son más heterogéneos, puesto que se le otorga una reducción de los casos de infarto de miocardio en pacientes con psoriasis, pero no en el riesgo de accidentes cerebrovasculares y otros MACEs^{210,278}; y en nuestro caso conseguimos confirmar una mejor funcional a nivel de interacción leucocito-endotelio, pero no una reducción directa de las moléculas de adhesión, lo cual podría apoyar la idea que es capaz de ejercer un efecto cardioprotector, pero menos marcado que el efectuado por ADA y/o SEC, y con la desventaja de que puede causar toxicidad en órganos diana con el uso a largo plazo²⁴⁴.

Así, y considerando que cada vez hay una mayor concienciación de la necesidad de realizar una detección temprana de enfermedades cardiovasculares subclínicas y de factores de riesgo cardiovasculares adicionales en pacientes psoriásicos^{57,203,247}, y de tenerlo en cuenta a la

hora de elegir la terapia más acorde a ello^{157,182,244}, nuestros resultados demuestran que no todos los fármacos biológicos tienen un impacto positivo en la inflamación vascular concomitante a las psoriasis y alimentan el debate en curso sobre la idoneidad del inicio temprano del tratamiento con determinados biológicos –fundamentalmente, anti-TNF α y anti-IL17– en pacientes con psoriasis con alto riesgo de desarrollar ECVs.



Conclusiones

1. La psoriasis inducida por IMQ en un modelo murino produce un incremento de la interacción leucocito-endotelio capaz de generar un entorno vascular protrombótico. En este modelo, concentraciones clínicas de fármacos anti-TNF α y anti-IL17, pero no anti-IL12/23, evitan el reclutamiento de neutrófilos por parte del endotelio y protegen de la generación de trombosis en el modelo de inducción de trombosis por perfusión de FeCl₃.
2. Los leucocitos de pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (*naïve*) presentan una mayor capacidad de interacción con el endotelio que los leucocitos de la población general: muestran un mayor número de leucocitos en rodamiento, una menor velocidad de rodamiento y mayor adhesión, lo que se traduce en una mayor inflamación vascular. Este incremento es atribuible al aumento en la expresión de la conformación activa de las integrinas β 2 Mac-1 y CR4. Los neutrófilos son el tipo celular que muestra mayores cambios, tanto funcionales como proteicos, por lo que sería el tipo celular principalmente implicado en la inflamación vascular asociada a la psoriasis.
3. La cantidad de complejos plaqueta-leucocito en sangre periférica de pacientes con psoriasis moderada-grave sin tratamiento sistémico (*naïve*) es mayor que en la población general, por lo que estos agregados podrían ser otro factor contribuyente al aumento de la activación leucocitaria en estos pacientes. Además, el porcentaje de complejos neutrófilo-plaqueta guarda una relación directa con el número de neutrófilos en fase de rodamiento en los pacientes *naïve*, lo que convierte a la medida de la cantidad de complejos neutrófilo-plaqueta en un potencial parámetro clínico para evaluar la

CONCLUSIONES

vulnerabilidad vascular de los pacientes con psoriasis moderada-grave.

4. En los pacientes con psoriasis, el bloqueo de las citocinas TNF α (ADA) o IL-17A (SEC), pero no el de IL-12/23 (UST), controla, no sólo las manifestaciones cutáneas, sino también la inflamación vascular asociada, mediante la atenuación de la expresión de las integrinas β 2 Mac-1 y CR4 en los neutrófilos. Por tanto, podemos concluir que las citocinas TNF α e IL-17A tienen un papel destacable en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular asociada a la psoriasis.
5. El tratamiento convencional con MTX controla la interacción leucocito-endotelio modulando el estado de activación de las moléculas de adhesión, pero no su expresión proteica. Este efecto podría deberse a la unión de la adenosina a sus receptores A_{2a} y A_{2b}, ya que el mecanismo antiinflamatorio propuesto para MTX implica el aumento sérico de las concentraciones de adenosina.
6. En general, nuestros resultados demuestran que la psoriasis coexiste con un estado de inflamación vascular que conduce a un mayor riesgo de eventos cardiovasculares como la trombosis, lo que la convierte en un factor de riesgo cardiovascular. Los fármacos anti-TNF α y anti-IL17, pero no los anti-IL-12/23, previenen este estado, lo que, unido a su ventajoso perfil de seguridad con respecto a las terapias convencionales, alimenta el debate en curso sobre la idoneidad de un inicio más temprano del tratamiento con productos biológicos seleccionados en pacientes con psoriasis con alto riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular.



Bibliografía

1. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *Lancet*. 2021 Apr 3;397(10281):1301-1315.
2. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA*. 2020;323(19):1945.
3. Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, Lebwohl MG, Gladman DD, Wu JJ, Mehta NN, Finlay AY, Gottlieb AB. Psoriasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Nov 24;2:16082.
4. Michalek IM, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Feb;31(2):205-212.
5. Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, Augustin M, Griffiths CEM, Ashcroft DM; Global Psoriasis Atlas. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ*. 2020 May 28;369:m1590.
6. World Health Organisation. Global Report on Psoriasis. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/204417>.
7. Ferrándiz C, Carrascosa JM, Toro M. Prevalence of psoriasis in Spain in the age of biologics. *Actas Dermosifiliogr*. 2014 Jun;105(5):504-9.
8. Academia Española de Dermatología y Venereología. Guía para pacientes con psoriasis. Actualización. 2020.
9. Wolff K, Johnson RA, Saavedra AP. Fitzpatrick. Atlas de Dermatología Clínica. 7th ed. McGraw-Hill Interamericana; 2014.
10. Nast A, Smith C, Spuls PI, Avila Valle G, Bata-Csörgö Z, Boonen H, De Jong E, Garcia-Doval I, Gisondi P, Kaur-Knudsen D, Mahil S, Mälikönen T, Maul JT, Mburu S, Mrowietz U, Reich K, Remenyik E, Rønholt KM, Sator PG, Schmitt-Egenolf M, Sikora M, Strömer K, Sundnes O, Trigos D, Van Der Kraaij G, Yawalkar N, Dressler C. EuroGuiDerm Guideline on the systemic treatment of Psoriasis vulgaris - Part 1: treatment and monitoring recommendations. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Nov;34(11):2461-2498.
11. Puig-Sanz L. La psoriasis, ¿una enfermedad sistémica? *Actas Dermosifiliográficas*. 2007;98(6):396-402.
12. Dhana A, Yen H, Yen H, Cho E. All-cause and cause-specific mortality in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80:1332-43.
13. Liang Y, Sarkar MK, Tsoi LC, Gudjonsson JE. Psoriasis: A mixed autoimmune and autoinflammatory disease. *Curr Opin Immunol*. 2017;49:1-8.
14. Dand N, Mahil SK, Capon F, Smith CH, Simpson MA, Barker JN. Psoriasis and Genetics. *Acta Derm Venereol*. 2020 Jan 30;100(3):adv00030.
15. Mahil SK, Capon F, Baker JN. Genetics of psoriasis. *Dermatol Clin*. 2015;33:1-11.
16. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 23;20(6):1475.

17. Kim J, Krueger JG. The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin.* 2015;33(1):13-23.
18. Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, Arai N, Gallo RL, Digiovanni J, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med.* 2010;207:2921–2930.
19. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of disease: psoriasis. *N Engl J Med.* 2009;361(5):496-509.
20. Kolbinger F, Loesche C, Valentin MA, Jiang X, Cheng Y, Jarvis P, Peters T, Calonder C, Bruin G, Polus F, Aigner B, Lee DM, Bodenlenz M, Sinner F, Pieber TR, Patel DD. β -Defensin 2 is a responsive biomarker of IL-17A-driven skin pathology in patients with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Mar;139(3):923-932.e8.
21. Morizane S, Yamasaki K, Muhleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptide Il-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol.* 2012;132:135–143.
22. Santini SM, Lapenta C, Donati S, Spadaro F, Belardelli F, Ferrantini M. Interferon- γ -conditioned human monocytes combine a TH1-orienting attitude with the induction of autologous TH17 responses: Role of IL-23 and IL-12. *PLoS ONE.* 2011;6:e17364.
23. Späh F. Inflammation in atherosclerosis and psoriasis: common pathogenic mechanisms and the potential for an integrated treatment approach. *Br J Dermatol.* 2008;159(Suppl 2):10-17.
24. Lwan W, Nestle FO. Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33(5)(suppl 93):S2-S6.
25. Reich K, Papp KA, Matheson RT, Tu JH, Bissonnette R, Bourcier M, Gratton D, Kunyetz RA, Poulin Y, Rosoph LA, Stingl G, Bauer WM, Salter JM, Falk TM, Blödorn-Schlicht NA, Hueber W, Sommer U, Schumacher MM, Peters T, Kriehuber E, Lee DM, Wiczorek GA, Kolbinger F, Bleul CC. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol.* 2015 Jul;24(7):529-35.
26. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34:149–62.
27. Wang WM, Jin HZ. Role of Neutrophils in Psoriasis. *J Immunol Res.* 2020 Jun 5;2020:3709749.
28. Lorthois I, Asselineau D, Seyler N, Pouliot R. Contribution of in vivo and organotypic 3D models to understanding the role of macrophages and neutrophils in the pathogenesis of psoriasis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:7215072.
29. Akhtar T, Wani WY, Kamal MA, Kaur R. Role of Angiogenic Growth Factors in Psoriasis: A Review. *Curr Drug Metab.* 2018;19(11):910-916.

30. Sankar L, Arumugam D, Boj S, Pradeep P. Expression of Angiogenic Factors in Psoriasis Vulgaris. *J Clin Diagn Res.* 2017 Mar;11(3):EC23-EC27.
31. Armstrong AW, Voyles SV, Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. Angiogenesis and oxidative stress: common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J Dermatol Sci.* 2011;63(1):1-9.
32. Mancheno Valencia A, Rosas Manzano A, Toussaint Caire S, Lacy Niebla RM. Coexistence of vitiligo and psoriasis, case series and etiopathogenic perspectives. *Rev Argent Dermatol.* 2015;96:80-91.
33. Bruce AJ, Rogers RS 3rd. Oral psoriasis. *Dermatol Clin.* 2003 Jan;21(1):99-104.
34. Korman NJ. Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence? *Br J Dermatol.* 2020;182:823–824.
35. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.* 2005;2005(5):273-9.
36. Suárez-Fariñas M, Li K, Fuentes-Duculan J, Hayden K, Brodmerkel C, Krueger JG. Expanding the psoriasis disease profile: interrogation of the skin and serum of patients with moderate-to-severe psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2012 Nov;132(11):2552-64.
37. de Oliveira PS, Cardoso PR, Lima EV, Pereira MC, Duarte AL, Pitta Ida R, Rêgo MJ, Pitta MG. IL-17A, IL-22, IL-6, and IL-21 Serum Levels in Plaque-Type Psoriasis in Brazilian Patients. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:819149.
38. Schön MP, Broekaert SM, Erpenbeck L. Sexy again: the renaissance of neutrophils in psoriasis. *Exp Dermatol.* 2017 Apr;26(4):305-311.
39. Mehta NN, Yu Y, Saboury B, Foroughi N, Krishnamoorthy P, Raper A, Baer A, Antigua J, Van Voorhees AS, Torigian DA, Alavi A, Gelfand JM. Systemic and vascular inflammation in patients with moderate to severe psoriasis as measured by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography (FDG-PET/CT): a pilot study. *Arch Dermatol.* 2011 Sep;147(9):1031-9.
40. Hjuler KF, Gormsen LC, Vendelbo MH, Egeberg A, Nielsen J, Iversen L. Increased global arterial and subcutaneous adipose tissue inflammation in patients with moderate-to-severe psoriasis. *Br J Dermatol.* 2017 Mar;176(3):732-740.
41. Machado-Pinto J, Dos Santos Diniz M, Couto Bavoso N. Psoriasis: new comorbidities. *An Bras Dermatol.* 2016;91(1):8-14.
42. Egeberg A, Mallbris L, Warren RB, Bachelez H, Gislasen GH, Hansen PR, Skov L. Association between psoriasis and inflammatory bowel disease: a Danish nationwide cohort study. *Br J Dermatol.* 2016 Sep;175(3):487-92.

43. Faustini F, Simon D, Oliveira I, Kleyer A, Haschka J, Englbrecht M, Cavalcante AR, Kraus S, Tabosa TP, Figueiredo C, Hueber AJ, Kocijan R, Cavallaro A, Schett G, Sticherling M, Rech J. Subclinical joint inflammation in patients with psoriasis without concomitant psoriatic arthritis: a cross-sectional and longitudinal analysis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Dec;75(12):2068-2074.
44. Mehta NN, Yu Y, Pinnelas R, Krishnamoorthy P, Shin DB, Troxel AB, Gelfand JM. Attributable risk estimate of severe psoriasis on major cardiovascular events. *Am J Med*. 2011 Aug;124(8):775.e1-6.
45. Mehta NN, Azfar RS, Shin DB, Neimann AL, Troxel AD, Gelfand JM. Patients with severe psoriasis are at increased risk of cardiovascular mortality: Cohort study using the general practice research database. *Eur Heart J*. 2010;31(8):1000-6.
46. Choudhary S, Patel R, Pradhan D, Deval R, Singh H, Thomas G, Jain AK. Psoriasis and cardiovascular disorders: association or epiphenomenon? Meta-analysis of observational studies. *3 Biotech*. 2020;10(3):104.
47. Boehncke WH, Boehncke S. Cardiovascular mortality in psoriasis and psoriatic arthritis: Epidemiology, pathomechanisms, therapeutic implications, and perspectives. *Current Rheumatology Reports*. 2012;14:343-8.
48. Candia R, Ruiz A, Torres-Robles R, Chávez-Tapia N, Méndez-Sánchez N, Arrese M. Risk of non-alcoholic fatty liver disease in patients with psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Apr;29(4):656-62.
49. Hannuksela-Svahn A, Pukkala E, Läärä E, Poikolainen K, Karvonen J. Psoriasis, its treatment, and cancer in a cohort of Finnish patients. *J Invest Dermatol*. 2000;114(3):587-90.
50. Margolis D, Bilker W, Hennessy S, Vittorio C, Santanna J, Strom BL. The Risk of Malignancy Associated With Psoriasis. *Arch Dermatol*. 2001;137(6):778-783.
51. Gelfand JM, Berlin J, Van Voorhees A, Margolis DJ. Lymphoma Rates Are Low but Increased in Patients With Psoriasis: Results From a Population-Based Cohort Study in the United Kingdom. *Arch Dermatol*. 2003;139(11):1425-1429.
52. Gelfand JM, Shin DB, Neimann AL, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. The risk of lymphoma in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2006 Oct;126(10):2194-201.
53. Takeshita J, Grewal S, Langan SM, Mehta NN, Ogdie A, Van Voorhees AS, Gelfand JM. Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Mar;76(3):377-390.
54. Egeberg A, Thyssen JP, Jensen P, Gislason GH, Skov L. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis and psoriatic arthritis: a nationwide cohort study. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(7):819-24.
55. Boehncke WH. Psoriasis and psoriatic arthritis: flip sides of the coin? *Acta Derm Venereol*. 2016;96(4):436-41.

56. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJ, Kvien TK, Dougados M, Radner H, Atzeni F, Primdahl J, Södergren A, Wallberg Jonsson S, van Rompay J, Zabalán C, Pedersen TR, Jacobsson L, de Vlam K, Gonzalez-Gay MA, Semb AG, Kitas GD, Smulders YM, Szekanecz Z, Sattar N, Symmons DP, Nurmohamed MT. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):17-28.
57. Garshick MS, Ward NL, Krueger JG, Berger JS. Cardiovascular Risk in Patients With Psoriasis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(13):1670-1680.
58. Ahlehoff O, Gislason GH, Charlot M, Jørgensen CH, Lindhardsen J, Olesen JB, Abildstrøm SZ, Skov L, Torp-Pedersen C, Hansen PR. Psoriasis is associated with clinically significant cardiovascular risk: a Danish nationwide cohort study. *J Intern Med*. 2011 Aug;270(2):147-57.
59. Ahlehoff O, Skov L, Gislason G, Lindhardsen J, Kristensen SL, Iversen L, Lasthein S, Gniadecki R, Dam TN, Torp-Pedersen C, Hansen PR. Cardiovascular disease event rates in patients with severe psoriasis treated with systemic anti-inflammatory drugs: a Danish real-world cohort study. *J Intern Med*. 2013 Feb;273(2):197-204.
60. Hu SC, Lan CE. Psoriasis and cardiovascular comorbidities: focusing on severe vascular events, cardiovascular risk factors and implications for treatment. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2211.
61. McDonald CJ, Calabresi P. Occlusive vascular disease in psoriatic patients. *N Engl J Med*. 1973;288:912.
62. Dowlatshahi EA, Kavousi M, Nijsten T, Ikram MA, Hofman A, Franco OH, Wakkee M. Psoriasis is not associated with atherosclerosis and incident cardiovascular events: The Rotterdam Study. *J Invest Dermatol*. 2013;133:2347-2354.
63. Parisi R, Rutter MK, Lunt M, Young HS, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM; Identification and Management of Psoriasis Associated Comorbidity (IMPACT) project team. Psoriasis and the Risk of Major Cardiovascular Events: Cohort Study Using the Clinical Practice Research Datalink. *J Invest Dermatol*. 2015 Sep;135(9):2189-2197.
64. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Sep 28;56(14):1113-32.
65. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26:364-373.
66. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. *Thromb Res*. 2008;122(6):727-35.

67. Singh S, Young P, Armstrong AW. Relationship between psoriasis and metabolic syndrome: A systematic review. *G Ital Dermatol Venereol*. 2016;151:663-677.
68. Chen YJ, Wu CY, Shen JL, Chu SY, Chen CK, Chang YT, Chen CM. Psoriasis independently associated with hyperleptinemia contributing to metabolic syndrome. *Arch Dermatol*. 2008;144(12):1571-5.
69. Masson W, Galimberti ML, Anselmi CL, Cagide A, Galimberti RL. Coronary artery disease in patients with psoriasis. *Medicina (B Aires)*. 2013;73(5):423-7.
70. Blegvad C, Nybo Andersen AM, Groot J, Zachariae C, Barker J, Skov L. Clinical characteristics including cardiovascular and metabolic risk factors in adolescents with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020.
71. Ruiz Carrascosa JC, Arias Santiago S. Psoriasis and metabolic síndrome. *Pie I (Barc., Ed. impr)*. 2010;25(3):133-145.
72. Egeberg A, Gisondi P, Carrascosa JM, Warren RB, Mrowietz U. The role of the IL-23/Th17 pathway in cardio-metabolic comorbidity associated with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020.
73. Boehncke WH. Systemic Inflammation and Cardiovascular Comorbidity in Psoriasis Patients: Causes and Consequences. *Front Immunol*. 2018 Apr 5;9:579.
74. Caiazza G, Fabbrocini G, Di Caprio R, Raimondo A, Scala E, Balato N, Balato A. Psoriasis, Cardiovascular Events, and Biologics: Lights and Shadows. *Front Immunol*. 2018;9:1668.
75. Masson W, Lobo M, Molinero G. Psoriasis and Cardiovascular Risk: A Comprehensive Review. *Adv Ther*. 2020;37:2017-2033.
76. Ma L, Li M, Wang H, Li Y, Bai B. High prevalence of cardiovascular risk factors in patients with moderate or severe psoriasis in northern China. *Arch Dermatol Res*. 2014 Apr;306(3):247-51.
77. Shah K, Mellars L, Changolkar A, Feldman SR. Real-world burden of comorbidities in US patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77:287-292.e.4.
78. Wakkee M, Herings RMC, Nijsten T. Psoriasis may not be an independent risk factor for acute ischemic heart disease hospitalizations: results of a large population-based Dutch cohort. *J Invest Dermatol*. 2010;130(4):962-7.
79. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of Myocardial Infarction in Patients With Psoriasis. *JAMA*. 2006;296(14):1735.
80. Ahlehoff O, Gislason GH, Jørgensen CH, Lindhardsen J, Charlot M, Olesen JB, Abildstrøm SZ, Skov L, Torp-Pedersen C, Hansen PR. Psoriasis and risk of atrial fibrillation and ischaemic stroke: a Danish Nationwide Cohort Study. *Eur Heart J*. 2012;33(16):2054-64.

81. Gelfand JM, Dommasch ED, Shin DB, Azfar RS, Kurd SK, Wang X, Troxel AB. The risk of stroke in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(10):2411-8.
82. Fernández-Armenteros JM, Gómez-Arbonés X, Buti-Soler M, Betriu-Bars A, Sanmartin-Novell V, Ortega-Bravo M, Martínez-Alonso M, Garí E, Portero-Otín M, Santamaria-Babi L, Casanova-Seuma JM. Psoriasis, metabolic syndrome and cardiovascular risk factors. A population-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(1):128-135.
83. Lai YC, Yew YW. Psoriasis as an independent risk factor for cardiovascular disease: an epidemiologic analysis using a national database. *J Cutan Med Surg*. 2016;20(4):327-33.
84. Ogdie A, Troxel AB, Mehta NN, Gelfand JM. Psoriasis and cardiovascular risk: strength in numbers part 3. *J Invest Dermatol*. 2015;135(9):2148-50.
85. Raaby L, Ahlehoff O, de Thurah A. Psoriasis and cardiovascular events: updating the evidence. *Arch Dermatol Res*. 2017;309(3):225-8.
86. Martinez-Moreno A, Ocampo-Candiani J, Garza-Rodriguez V. Psoriasis and Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *Korean J Fam Med*. 2021 Sep;42(5):345-355.
87. Puig Lluís. Cardiometabolic comorbidities in psoriasis and psoriatic arthritis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):58.
88. Lockshin B, Balagula Y, Merola JF. Interleukin 17, inflammation, and cardiovascular risk in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79:345-52.
89. Gonzalez-Cantero A, Gonzalez-Cantero J, Sanchez-Moya AI, Perez-Hortet C, Arias-Santiago S, Schoendorff-Ortega C, Gonzalez-Calvin JL. Subclinical atherosclerosis in psoriasis. Usefulness of femoral artery ultrasound for the diagnosis, and analysis of its relationship with insulin resistance. *PLoS One*. 2019 Feb 8;14(2):e0211808.
90. Youn SW, Kang SY, Kim SA, Park GY, Lee WW. Subclinical systemic and vascular inflammation detected by (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with mild psoriasis. *J Dermatol*. 2015 Jun;42(6):559-66.
91. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9): 678-89.
92. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011; 17(11): 1423-36.92
93. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J*. 2017 Mar 14;38(11):785-791.
94. Flammer AJ, Ruschitzka F. Psoriasis and atherosclerosis: two plaques, one syndrome? *Eur Heart J*. 2012;33:89-91.

95. Armstrong AW, Voyles SV, Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. A tale of two plaques: convergent mechanisms of T-cell-mediated inflammation in psoriasis and atherosclerosis. *Exp Dermatol*. 2011 Jul;20(7):544-9.
96. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(9):3893-7.
97. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999 Jul;145(1):33-43.
98. Methe H, Brunner S, Wiegand D, Nabauer M, Koglin J, Edelman ER. Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* (2005) 45(12):1939-45.
99. Girolomoni G, Strohal R, Puig L, Bachelez H, Barker J, Boehncke WH, Prinz JC. The role of IL-23 and the IL-23/TH 17 immune axis in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Oct;31(10):1616-1626.
100. Amin M, Darji K, No DJ, Bhutani T, Wu JJ. Review of IL-17 inhibitors for psoriasis. *J Dermatolog Treat*. 2017;10:1-6.
101. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2045-51.
102. Toussiroot E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11:159-68.
103. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*. 2012;110(6):875-88.
104. Sajja AP, Joshi AA, Teague HL, Dey AK, Metha NN. Potential immunological links between psoriasis and cardiovascular disease. *Front Immunol*. 2018;9:1234.
105. van Leeuwen M, Gijbels MJ, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, de Winther MP, Tervaert JW. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jan;28(1):84-9.
106. Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng CN, Björkström NK, Malmberg KJ, Lindbom L, Eriksson EE. Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice. *Am J Pathol*. 2010 Jul;177(1):493-500.
107. Hosokawa T, Kumon Y, Kobayashi T, Enzan H, Nishioka Y, Yuri K, Wakiguchi H, Sugiura T. Neutrophil infiltration and oxidant-production in human atherosclerotic carotid plaques. *Histol Histopathol*. 2011 Jan;26(1):1-11.
108. Kramer MC, Rittersma SZ, de Winter RJ, Ladich ER, Fowler DR, Liang YH, Kutys R, Carter-Monroe N, Kolodgie FD, van der Wal AC, Virmani R. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jan 12;55(2):122-32.

109. Deng Y, Chang C, Lu Q. The inflammatory response in psoriasis: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* (2016) 50(3):377–89.
110. Costa S, Marini O, Bevilacqua D, DeFranco AL, Hou B, Lonardi S, Vermi W, Rodegher P, Panato A, Tagliaro F, Lowell CA, Cassatella MA, Girolomoni G, Scapini P. Role of MyD88 signaling in the imiquimod-induced mouse model of psoriasis: focus on innate myeloid cells. *J Leukoc Biol*. 2017 Sep;102(3):791-803.
111. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity*. 2017;47(4):621–34.
112. Peled M, Fisher EA. Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression. *Front Immunol*. 2014;5:579.
113. Tamagawa-Mineoka R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *J Dermatol Sci*. 2015;77(2):93–101.
114. Fan Z, Wang L, Jiang H, Lin Y, Wang Z. Platelet Dysfunction and Its Role in the Pathogenesis of Psoriasis. *Dermatology*. 2021;237(1):56-65.
115. Weber B, Merola JF, Husni ME, Di Carli M, Berger JS, Garshick MS. Psoriasis and Cardiovascular Disease: Novel Mechanisms and Evolving Therapeutics. *Curr Atheroscler Rep*. 2021;23(11):67.
116. Ludwig RJ, Schultz JE, Boehncke WH, Podda M, Tandl C, Krombach F, Baatz H, Kaufmann R, von Andrian UH, Zollner TM. Activated, not resting, platelets increase leukocyte rolling in murine skin utilizing a distinct set of adhesion molecules. *J Invest Dermatol*. 2004;122:830–836.
117. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3378–84.
118. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(6):368–80.
119. Jamasbi J, Ayabe K, Goto S, Nieswandt B, Peter K, Siess W. Platelet receptors as therapeutic targets: past, present and future. *Thromb Haemost*. 2017;117(7):1249–57.
120. Hansson GK. Inflammation and atherosclerosis: the end of a controversy. *Circulation*. 2017;136(20):1875–7.
121. Londoño A, González C, Castro L y Puig L. Psoriasis y su relación con el síndrome metabólico. *Rev Colomb Reumatol*. 2013;20(4):228-236.
122. Boehncke WH, Boehncke S, Tobin AM, Kirby B. The 'psoriatic march': a concept of how severe psoriasis may drive cardiovascular comorbidity. *Exp Dermatol*. 2011 Apr;20(4):303-7.
123. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*. 1993;44:121–31.
124. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113(15):1888–904.

125. Boehncke S, Thaci D, Beschmann H, Ludwig RJ, Ackermann H, Badenhoop K, Boehncke WH. Psoriasis patients show signs of insulin resistance. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157(6):1249-51.
126. Ucak S, Ekmekci TR, Basat O, Koslu A, Altuntas Y. Comparison of various insulin sensitivity indices in psoriatic patients and their relationship with type of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20(5):517-22.
127. Karadag AS, Yavuz B, Ertugrul DT, Akin KO, Yalcin AA, Deveci OS, Ata N, Kucukazman M, Dal K. Is psoriasis a pre-atherosclerotic disease? Increased insulin resistance and impaired endothelial function in patients with psoriasis. *Int J Dermatol*. 2010 Jun;49(6):642-6.
128. Gisondi P, Fantin F, Del Giglio M, Valbusa F, Marino F, Zamboni M, Girolomoni G. Chronic plaque psoriasis is associated with increased arterial stiffness. *Dermatology*. 2009;218(2):110-3.
129. Balci DD, Balci A, Karazincir S, Ucar E, Iyigun U, Yalcin F, Seyfeli E, Inandi T, Egilmez E. Increased carotid artery intima-media thickness and impaired endothelial function in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Jan;23(1):1-6.
130. Ulusoy RE, Karabudak O, Yokusoglu M, Kilicaslan F, Kirilmaz A, Cebeci BS. Noninvasive assessment of impaired endothelial function in psoriasis. *Rheumatol Int*. 2010;30(4):479-83.
131. Cerman AA, Bozkurt S, Sav A, Tulunay A, Elbaşı MO, Ergun T. Serum leptin levels, skin leptin and leptin receptor expression in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):820-6.
132. Zheng C, Liu Z. Vascular function, insulin action, and exercise: An intricate interplay. *Trends Endocrinol. Metab*. 2015;26:297-304.
133. Yuan SY, Breslin JW, Perrin R, Gaudreault N, Guo M, Kargozaran H, Wu MH. Microvascular Permeability in Diabetes and Insulin Resistance. *Microcirculation*. 2007;14:363-373.
134. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
135. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006 Mar;17(1):4-12.
136. Lago R, Gómez R, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O. Leptin beyond body weight regulation – current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cell Immunol*. 2008;252(1-2):139-45.
137. Ford ML, Adams AB, Pearson TC. Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat Rev Nephrol*. 2014; 10: 14-24.
138. Akkara-Veetil BM, Matteson EL, Maradit-Kremers H, McEvoy MT, Crowson CS. Trends in lipid profile in patients with psoriasis: a population based analysis. *BMC Dermatol*. 2012;30(12):20.

139. Mehta NN, Li R, Krishnamoorthy P, Yu Y, Farver W, Rodrigues A, Raper A, Wilcox M, Baer A, DerOhannesian S, Wolfe M, Reilly MP, Rader DJ, VanVoorhees A, Gelfand JM. Abnormal lipoprotein particles and cholesterol efflux capacity in patients with psoriasis. *Atherosclerosis*. 2012 Sep;224(1):218-21.
140. Asha K, Singal A, Sharma SB, Arora VK, Aggarwal A. Dyslipidaemia and oxidative stress in patients of psoriasis: emerging cardiovascular risk factors. *Indian J Med Res*. 2017;146(6):708–13.
141. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta. Implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110(14):2032- 8.
142. Nilsson J, Wigren M, Shah PK. Vaccines against atherosclerosis. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12:311-21.
143. Karunakaran D, Geoffrion M, Wei L, Gan W, Richards L, Shangari P, DeKemp EM, Beanlands RA, Perisic L, Maegdefessel L, Hedin U, Sad S, Guo L, Kolodgie FD, Virmani R, Ruddy T, Rayner KJ. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Sci Adv*. 2016;2(7):e1600224.
144. Tuenter A, Selwaness M, Arias Lorza A, Schuurbiers JC, Speelman L, Cibis M, van der Lugt A, de Bruijne M, van der Steen AF, Franco OH, Vernooij MW, Wentzel JJ. High shear stress relates to intraplaque haemorrhage in asymptomatic carotid plaques. *Atherosclerosis*. 2016;251:348-54.
145. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):168-75.
146. van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 May;24(5):824-33.
147. Brown E. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. *Semin Hematol*.1997;34(4):319-26.
148. Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum*. 1993 Feb;36(2):147-57.
149. McEver RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:363-96.
150. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.
151. Alon R, Feizi T, Yuen CT, Fuhlbrigge RC, Springer TA. Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J Immunol*. 1995;154(10):5356-66.
152. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*.2011;17(11):1423-36.
153. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012;92(6):1167-75.

154. Bournerias I. Psoriasis. EMC-Tratado de Medicina. 2014;18(3):1-10.
155. Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, Franke J, Antoniou C, Arenberger P, Balieva F, Bylaite M, Correia O, Daudén E, Gisondi P, Iversen L, Kemény L, Lahfa M, Nijsten T, Rantanen T, Reich A, Rosenbach T, Segaeert S, Smith C, Talme T, Volc-Platzer B, Yawalkar N. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res*. 2011 Jan;303(1):1-10.
156. Feldman SR. Treatment of psoriasis in adults. *UpToDate*. 2019. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-psoriasis-in-adults>.
157. Martin G, Young M, Aldredge L. Recommendations for Initiating Systemic Therapy in Patients with Psoriasis. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2019;12(4):13-2.
158. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de risankizumab (Skyrizi®) en el tratamiento de psoriasis en placas. IPT, 7/2020.V2. 2020. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT_7-2020-risankizumab-Skyrizi-v2.pdf?x63731.ç.
159. Yamasaki E, Soma Y, Kawa Y, Mizoguchi M. Methotrexate inhibits proliferation and regulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by cultured human umbilical vein endothelial cells. *Br J Dermatol*. 2003;149(1):30-387.
160. Herman S, Zurgil N, Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res*. 2005;54(7):273-280.
161. Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(10):1189-1196.
162. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest*. 1998;102(2):322-328.
163. Yan K, Xu W, Huang Y, Zhang Z, Huang Q, Xin KZ, Ma Y, Han L. Methotrexate restores the function of peripheral blood regulatory T cells in psoriasis vulgaris via the CD73/AMPK/mTOR pathway. *Br J Dermatol*. 2018 Oct;179(4):896-905.
164. Cronstein BN, Sitkovsky M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Jan;13(1):41-51.
165. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019 May;86(3):301-307.

166. Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. 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.* 2000;43(3):656-663.
167. Lindqvist T, Salah LA, Gillstedt M, Wennberg AM, Osmancevic A. Methotrexate Management in Psoriasis: Are We Following the Guidelines? *Acta Derm Venereol.* 2018 Apr;98(4):449-451.
168. Ho VC, Griffiths CE, Berth-Jones J, Papp KA, Vanaclocha F, Dauden E, Beard A, Puvanarajan L, Paul C. Intermittent short courses of cyclosporine microemulsion for the long-term management of psoriasis: A 2-year cohort study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001;44:643–651.
169. Maza A, Montaudié H, Sbidian E, Gallini A, Aractingi S, Aubin F, Bachelez H, Cribier B, Joly P, Jullien D, Le Maître M, Misery L, Richard MA, Ortonne JP, Paul C. Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 May;25 Suppl 2:19-27.
170. Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature.* 1988;332:850–853.
171. Harper RA. Specificity in the synergism between retinoic acid and EGF on the growth of adult human skin fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1988;178:254–263.
172. Gesser B, Johansen C, Rasmussen MK, Funding AT, Otkjaer K, Kjellerup RB, Kragballe K, Iversen L. Dimethylfumarate specifically inhibits the mitogen and stress-activated kinases 1 and 2 (MSK1/2): Possible role for its anti-psoriatic effect. *J Investig Dermatol.* 2007;127:2129–2137.
173. Lehmann JC, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igney FH, von Bonin A, Hennekes HH, Asadullah K, Docke WD. Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *J Investig Dermatol.* 2007;127:835–845.
174. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, Fontenot JD. Dmf, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an NRF2-independent manner. *J Neuroimmunol.* 2015;283:74–85
175. Oehrl S, Olaru F, Kunze A, Maas M, Pezer S, Schmitz M, Schakel K. Controlling the pro-inflammatory function of 6-sulfo LacNAc (sIa) dendritic cells with dimethylfumarate. *J Dermatol Sci.* 2017;87:278–284.

176. 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, Müller S, Orzechowski HD, Rosumeck S, Schmid-Ott G, Weberschock T, Rzany B; Deutsche Dermatologische Gesellschaft; Berufsverband Deutscher Dermatologen. German S3-guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (short version). *Arch Dermatol Res*. 2012 Mar;304(2):87-113.
177. Schafer PH, Parton A, Gandhi AK, Capone L, Adams M, Wu L, Bartlett JB, Loveland MA, Gilhar A, Cheung YF, Baillie GS, Houslay MD, Man HW, Muller GW, Stirling DI. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br J Pharmacol*. 2010 Feb;159(4):842-55.
178. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de apremilast (Otezla®) en psoriasis cutánea y artritis psoriásica. IPT, APREMILAST/V1/18122015. 2015. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-apremilast-Otezla.pdf>.
179. Stiff KM, Glines KR, Porter CL, Cline A, Feldman SR. Current pharmacological treatment guidelines for psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018;11:1209-1218.
180. European Medicines Agency. Biosimilars in the EU. Information guide for healthcare professionals. 2019.
181. Sbidian E, Chaimani A, Afach S, Doney L, Dressler C, Hua C, Mazaud C, Phan C, Hughes C, Riddle D, Naldi L, Garcia-Doval I, Le Cleach L. Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jan 9;1(1):CD011535.
182. Daudén E, Puig L, Ferrándiz C, Sánchez-Carazo JL, Hernanz-Hermosa JM; Spanish Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis: Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(Suppl 2):1-18.
183. Tokuyama M, Mabuchi T. New Treatment Addressing the Pathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7488.
184. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Guía de práctica farmacéutica en psoriasis. 2019.
185. Lucka TC, Pathirana D, Sammain A, Bachmann F, Rosumeck S, Erdmann R, Schmitt J, Orawa H, Rzany B, Nast A. Efficacy of systemic therapies for moderate-to-severe psoriasis: a systematic review and meta-analysis of long-term treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Nov;26(11):1331-44.

186. Ohtsuki M, Terui T, Ozawa A, Morita A, Sano S, Takahashi H, Komine M, Etoh T, Igarashi A, Torii H, Asahina A, Nemoto O, Nakagawa H; Biologics Review Committee of the Japanese Dermatological Association. Japanese guidance for use of biologics for psoriasis (the 2013 version). *J Dermatol*. 2013 Sep;40(9):683-95.
187. Pasut G. Pegylation of biological molecules and potential benefits: pharmacological properties of certolizumab pegol. *BioDrugs*. 2014 Apr;28 Suppl 1:S15-23.
188. Gall JS, Kalb RE. Infliximab for the Treatment of Plaque Psoriasis. *Biologics*. 2008;2:115–124.
189. Alwawi EA, Mehlis SL, Gordon KB. Treating Psoriasis with Adalimumab. *Ther. Clin. Risk Manag*. 2008;4:345–351.
190. Cantini F, Nannini C, Niccoli L, Petrone L, Ippolito G, Goletti D. Risk of Tuberculosis Reactivation in Patients with Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Receiving Non-Anti-TNF-Targeted Biologics. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:8909834.
191. Bagel J, Duffin KC, Moore A, Ferris LK, Siu K, Steadman J, Kianifard F, Nyirady J, Lebwohl M. The effect of secukinumab on moderate-to-severe scalp psoriasis: Results of a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3b study. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Oct;77(4):667-674.
192. Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, Langley RG, Luger T, Ohtsuki M, Reich K, Amato D, Ball SG, Braun DK, Cameron GS, Erickson J, Konrad RJ, Muram TM, Nickoloff BJ, Osuntokun OO, Secrest RJ, Zhao F, Mallbris L, Leonardi CL; UNCOVER-1 Study Group; UNCOVER-2 Study Group; UNCOVER-3 Study Group. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*. 2016 Jul 28;375(4):345-56.
193. Papp KA, Reich K, Paul C, Blauvelt A, Baran W, Bolduc C, Toth D, Langley RG, Cather J, Gottlieb AB, Thaçi D, Krueger JG, Russell CB, Milmont CE, Li J, Klekotka PA, Kricorian G, Nirula A. A prospective phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. 2016 Aug;175(2):273-86.
194. Puig L. Brodalumab: the first anti-IL-17 receptor agent for psoriasis. *Drugs Today (Barc)*. 2017 May;53(5):283-297.
195. López-Ferrer A, Vilarrasa E, Puig L. Secukinumab (AIN457) for the treatment of psoriasis. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 2015; 11: 1177–1188.
196. Papp KA, Leonardi CL, Blauvelt A, Reich K, Korman NJ, Ohtsuki M, Paul C, Ball S, Cameron GS, Erickson J, Zhang L, Mallbris L, Griffiths CEM. Ixekizumab treatment for psoriasis: integrated efficacy analysis of three double-blinded, controlled studies (UNCOVER-1, UNCOVER-2, UNCOVER-3). *Br J Dermatol*. 2018 Mar;178(3):674-681.
197. Foulkes AC, Warren RB. Brodalumab in Psoriasis: Evidence to Date and Clinical Potential. *Drugs Context*. 2019;8:1–11.

198. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, Puig L, Nakagawa H, Spelman L, Sigurgeirsson B, Rivas E, Tsai TF, Wasel N, Tying S, Salko T, Hampele I, Notter M, Karpov A, Helou S, Papavassilis C; ERASURE Study Group; FIXTURE Study Group. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med*. 2014 Jul 24;371(4):326-38.
199. Gordon KB, Duffin KC, Bissonnette R, Prinz JC, Wasfi Y, Li S, Shen YK, Szapary P, Randazzo B, Reich K. A Phase 2 Trial of Guselkumab versus Adalimumab for Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*. 2015 Jul 9;373(2):136-44.
200. Reich K, Papp KA, Blauvelt A, Tying SK, Sinclair R, Thaçi D, Nograles K, Mehta A, Cichanowitz N, Li Q, Liu K, La Rosa C, Green S, Kimball AB. Tildrakizumab versus placebo or etanercept for chronic plaque psoriasis (reSURFACE 1 and reSURFACE 2): results from two randomised controlled, phase 3 trials. *Lancet*. 2017 Jul 15;390(10091):276-288.
201. Papp K, Thaçi D, Reich K, Riedl E, Langley RG, Krueger JG, Gottlieb AB, Nakagawa H, Bowman EP, Mehta A, Li Q, Zhou Y, Shames R. Tildrakizumab (MK-3222), an anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody, improves psoriasis in a phase IIb randomized placebo-controlled trial. *Br J Dermatol*. 2015 Oct;173(4):930-9.
202. Papp KA, Blauvelt A, Bukhalo M, Gooderham M, Krueger JG, Lacour JP, Menter A, Philipp S, Sofen H, Tying S, Berner BR, Visvanathan S, Pamulapati C, Bennett N, Flack M, Scholl P, Padula SJ. Risankizumab versus Ustekinumab for Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*. 2017 Apr 20;376(16):1551-1560.
203. Cai J, Cui L, Wang Y, Li Y, Zhang X, Shi Y. Cardiometabolic Comorbidities in Patients With Psoriasis: Focusing on Risk, Biological Therapy, and Pathogenesis. *Front Pharmacol*. 2021 Nov 4;12:774808.
204. Menter A, Strober BE, Kaplan DH, Kivelevitch D, Prater EF, Stoff B, Armstrong AW, Connor C, Cordoro KM, Davis DMR, Elewski BE, Gelfand JM, Gordon KB, Gottlieb AB, Kavanaugh A, Kiselica M, Korman NJ, Kroshinsky D, Lebwohl M, Leonardi CL, Lichten J, Lim HW, Mehta NN, Paller AS, Parra SL, Pathy AL, Rupani RN, Siegel M, Wong EB, Wu JJ, Hariharan V, Elmets CA. Joint AAD-NPF guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Apr;80(4):1029-1072.
205. Mahil SK, Smith CH. Psoriasis biologics: a new era of choice. *Lancet*. 2019 Sep 7;394(10201):807-808.
206. Boehncke WH, Boehncke S. More tan skin-deep: the many dimensions of the psoriatic disease. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13968.
207. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Curzen N, Kiely P, Quinn M, Choy E, Ostor AJ, Edwards CJ. Tumour necrosis factor antagonists and the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology* (Oxford). 2011 Mar;50(3):518-31.

208. Mäki-Petäjä KM, Elkhawad M, Cheriyan J, Joshi FR, Ostör AJ, Hall FC, Rudd JH, Wilkinson IB. Anti-tumor necrosis factor- α therapy reduces aortic inflammation and stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2012 Nov 20;126(21):2473-80.
209. Tam LS, Kitas GD, González-Gay MA. Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis? *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jun;53(6):1108-19.
210. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, Siu S, Kraft J, Lynde C, Pope J, Gulliver W, Keeling S, Dutz J, Bessette L, Bissonnette R, Haraoui B. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar;74(3):480-9.
211. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5836-45.
212. Swindell WR, Michaels KA, Sutter AJ, Diaconu D, Fritz Y, Xing X, Sarkar MK, Liang Y, Tsoi A, Gudjonsson JE, Ward NL. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome Med*. 2017 Mar 9;9(1):24.
213. Hickey MJ, Granger DN, Kubes P. Molecular mechanisms underlying IL-4-induced leukocyte recruitment in vivo: a critical role for the alpha 4 integrin. *J Immunol*. 1999;163:3441-3448.
214. De Pablo C, Orden S, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues JV, Alvarez A. Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in vivo. *J Infect Dis*. 2013; 208(9):1448-53.
215. Gavins FNE. Intravital microscopy: new insights into cellular interactions. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12: 601-607.
216. Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):402-8.
217. Subramaniam S, Kanse SM. Ferric chloride-induced arterial thrombosis in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2014;4(4):151-64.
218. Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27: 2079-93.
219. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, Mangin PH, Gachet C. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011 Apr;9(4):779-89.

220. Zhu L, Giunzioni I, Tavori H, Covarrubias R, Ding L, Zhang Y, Ormseth M, Major AS, Stafford JM, Linton MF, Fazio S. Loss of Macrophage Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Confers Resistance to the Antiatherogenic Effects of Tumor Necrosis Factor- α Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Aug;36(8):1483-95.
221. Hausteil UF, Rytter M. Methotrexate in psoriasis: 26 years' experience with low-dose long-term treatment. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2000;14(5):382-8.
222. Amatore F, Villani AP, Tauber M, Viguier M, Guillot B; Psoriasis Research Group of the French Society of Dermatology (Groupe de Recherche sur le Psoriasis de la Société Française de Dermatologie). French guidelines on the use of systemic treatments for moderate-to-severe psoriasis in adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Mar;33(3):464-483.
223. Kolios AG, Yawalkar N, Anliker M, Boehncke WH, Borradori L, Conrad C, Gilliet M, Häusermann P, Itin P, Laffitte E, Mainetti C, French LE, Navarini AA. Swiss S1 Guidelines on the Systemic Treatment of Psoriasis Vulgaris. *Dermatology*. 2016;232(4):385-406.
224. De Pablo C, Orden S, Calatayud S, Marti-Cabrera M, Esplugues JV, Alvarez A. Differential effects of tenofovir/emtricitabine and abacavir/lamivudine on human leukocyte recruitment. *Antivir Ther*. 2012;17(8):1615-19.
225. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood*. 1991 Oct 1;78(7):1760-9.
226. Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets*. 2018;29(7):677-685.
227. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Sep 25;104(13):1533-7.
228. Qin S, Wen J, Bai XC, Chen TY, Zheng RC, Zhou GB, Ma J, Feng JY, Zhong BL, Li YM. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids protect against imiquimod-induced psoriasis-like inflammation via the IL-17/IL-23 axis. *Mol Med Rep*. 2014 Jun;9(6):2097-104.
229. Lee YB, Lee JY, Lee HJ, Yun ST, Lee JT, Kim HJ, Yu DS, Woo SY, Kim JW. Immunomodulatory effects of balneotherapy with hae-un-dae thermal water on imiquimod-induced psoriasis-like murine model. *Ann Dermatol*. 2014 Apr;26(2):221-30.
230. Johnson ED, Schell JC, Rodgers GM. The D-dimer assay. *Am J Hematol*. 2019 Jul;94(7):833-839.
231. Pircher J, Engelmann B, Massberg S, Schulz C. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2019;119(8):1274-1282.

232. Schoenwaelder SM, Jackson SP. Ferric chloride thrombosis model: unraveling the vascular effects of a highly corrosive oxidant. *Blood*. 2015 Dec 10;126(24):2652-3.
233. Ciciliano JC, Sakurai Y, Myers DR, Fay ME, Hechler B, Meeks S, Li R, Dixon JB, Lyon LA, Gachet C, Lam WA. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach. *Blood*. 2015 Aug 6;126(6):817-24.
234. Jagadeeswaran P, Cooley BC, Gross PL, Mackman N. Animal Models of Thrombosis from Zebrafish to Nonhuman Primates: Use in the Elucidation of New Pathologic Pathways and the Development of Antithrombotic Drugs. *Circ Res*. 2016;118(9):1363–79.
235. Parry TJ, Huang Z, Chen C, Connelly MA, Perzborn E, Andrade-Gordon P, Damiano BP. Arterial antithrombotic activity of rivaroxaban, an orally active factor Xa inhibitor, in a rat electrolytic carotid artery injury model of thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011 Dec;22(8):720-6.
236. Wong PC, Pinto DJP, Zhang D. Preclinical discovery of apixaban, a direct and orally bioavailable factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;31(4):478–92.
237. Pirro M, Stingeni L, Vaudo G, Mannarino MR, Ministrini S, Vonella M, Hansel K, Bagaglia F, Alaeddin A, Lisi P, Mannarino E. Systemic inflammation and imbalance between endothelial injury and repair in patients with psoriasis are associated with preclinical atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol*. 2015 Aug;22(8):1027-35.
238. Lebowhl M. Does Treatment of Psoriasis Reduce Cardiovascular Comorbidities? *J Invest Dermatol*. 2017 Aug;137(8):1612-1613.
239. Hugh J, Van Voorhees AS, Nijhawan RI, Bagel J, Lebowhl M, Blauvelt A, Hsu S, Weinberg JM. From the Medical Board of the National Psoriasis Foundation: The risk of cardiovascular disease in individuals with psoriasis and the potential impact of current therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Jan;70(1):168-77.
240. Wu JJ, Poon K-YT. Tumor necrosis factor inhibitor therapy and myocardial infarction risk in patients with psoriasis, psoriatic arthritis, or both. *J Drugs Dermatol* [Internet]. 2014;13(8):932–4.
241. Shaaban D, Al-Mutairi N. The effect of tumor necrosis factor inhibitor therapy on the incidence of myocardial infarction in patients with psoriasis: a retrospective study. *J Dermatolog Treat*. 2018;29:3-7.
242. Molina-Leyva A, Garrido-Pareja F, Ruiz-Carrascosa JC, Ruiz-Villaverde R. TNF-alpha inhibition could reduce biomarkers of endothelial dysfunction in patients with moderate to severe psoriasis: A 52-week echo-Doppler based quasi-experimental study. *Med Clin (Barc)*. 2018 Jun 22;150(12):465-468.

243. Bissonnette R, Harel F, Krueger JG, Guertin MC, Chabot-Blanchet M, Gonzalez J, Maari C, Delorme I, Lynde CW, Tardif JC. TNF- α Antagonist and Vascular Inflammation in Patients with Psoriasis Vulgaris: A Randomized Placebo-Controlled Study. *J Invest Dermatol*. 2017 Aug;137(8):1638-1645.
244. Kaushik SB, Lebwohl MG. Psoriasis: Which therapy for which patient: Psoriasis comorbidities and preferred systemic agents. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jan;80(1):27-40.
245. Mehta NN, Shin DB, Joshi AA, Dey AK, Armstrong AW, Duffin KC, Fuxench ZC, Harrington CL, Hubbard RA, Kalb RE, Menter A, Rader DJ, Reilly MP, Simpson EL, Takeshita J, Torigian DA, Werner TJ, Troxel AB, Tying SK, Vanderbeek SB, Van Voorhees AS, Playford MP, Ahlman MA, Alavi A, Gelfand JM. Effect of 2 Psoriasis Treatments on Vascular Inflammation and Novel Inflammatory Cardiovascular Biomarkers: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2018 Jun;11(6):e007394.
246. Knowles L, Nadeem N, Chowienczyk PJ. Do anti-tumour necrosis factor- α biologics affect subclinical measures of atherosclerosis and arteriosclerosis? A systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2020 May;86(5):837-851.
247. von Stebut E, Boehncke WH, Ghoreschi K, Gori T, Kaya Z, Thaci D, Schäffler A. IL-17A in Psoriasis and Beyond: Cardiovascular and Metabolic Implications. *Front Immunol*. 2020 Jan 15;10:3096.
248. Erbel C, Akhavanpoor M, Okuyucu D, Wangler S, Dietz A, Zhao L, Stellos K, Little KM, Lasitschka F, Doesch A, Hakimi M, Dengler TJ, Giese T, Blessing E, Katus HA, Gleissner CA. IL-17A influences essential functions of the monocyte/macrophage lineage and is involved in advanced murine and human atherosclerosis. *J Immunol*. 2014 Nov 1;193(9):4344-55.
249. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008 Apr;127(1):89-97.
250. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis* (2006) 17(8):699–706.
251. Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med*. 2009 Sep 28;206(10):2067-77.
252. Simon T, Taleb S, Danchin N, Laurans L, Rousseau B, Cattan S, Montely JM, Dubourg O, Tedgui A, Kotti S, Mallat Z. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2013 Feb;34(8):570-7.

253. von Stebut E, Reich K, Thaçi D, Koenig W, Pinter A, Körber A, Rassaf T, Waisman A, Mani V, Yates D, Frueh J, Sieder C, Melzer N, Mehta NN, Gori T. Impact of Secukinumab on Endothelial Dysfunction and Other Cardiovascular Disease Parameters in Psoriasis Patients over 52 Weeks. *J Invest Dermatol*. 2019 May;139(5):1054-1062.
254. Gelfand JM, Shin DB, Duffin KC, Armstrong AW, Blauvelt A, Tying SK, Menter A, Gottlieb S, Lockshin BN, Simpson EL, Kianifard F, Sarkar RP, Muscianisi E, Steadman J, Ahlman MA, Playford MP, Joshi AA, Dey AK, Werner TJ, Alavi A, Mehta NN. A Randomized Placebo-Controlled Trial of Secukinumab on Aortic Vascular Inflammation in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis (VIP-S). *J Invest Dermatol*. 2020 Sep;140(9):1784-1793.e2.
255. Frieder J, Kivelevitch D, Menter A. Secukinumab: a review of the antiIL-17A biologic for the treatment of psoriasis. *Ther Adv Chronic Dis*. 2018;9:5–21.
256. Munjal A, Khandia R. Atherosclerosis: orchestrating cells and biomolecules involved in its activation and inhibition. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;120:85-122.
257. Ye J, Wang Y, Wang Z, Liu L, Yang Z, Wang M, Xu Y, Ye D, Zhang J, Lin Y, Ji Q, Wan J. Roles and Mechanisms of Interleukin-12 Family Members in Cardiovascular Diseases: Opportunities and Challenges. *Front Pharmacol*. 2020 Mar 4;11:129.
258. Ait-Oufella H, Libby P, Tedgui A. Anticytokine Immune Therapy and Atherothrombotic Cardiovascular Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 Aug;39(8):1510-1519.
259. Ryan C, Leonardi CL, Krueger JG, Kimball AB, Strober BE, Gordon KB, Langley RG, de Lemos JA, Daoud Y, Blankenship D, Kazi S, Kaplan DH, Friedewald VE, Menter A. Association between biologic therapies for chronic plaque psoriasis and cardiovascular events: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 2011 Aug 24;306(8):864-71.
260. Gordon KB, Langley RG, Gottlieb AB, Papp KA, Krueger GG, Strober BE, Williams DA, Gu Y, Valdes JM. A phase III, randomized, controlled trial of the fully human IL-12/23 mAb briakinumab in moderate-to-severe psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2012 Feb;132(2):304-14.
261. Tzellos T, Kyrgidis A, Zouboulis CC. Re-evaluation of the risk for major adverse cardiovascular events in patients treated with anti-IL-12/23 biological agents for chronic plaque psoriasis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 May;27(5):622-7.
262. Chiricozzi A, Gisondi P, Girolomoni G. The pharmacological management of patients with comorbid psoriasis and obesity. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20:863–72.

263. Choi H, Uceda DE, Dey AK, Abdelrahman KM, Aksentijevich M, Rodante JA, Elnabawi YA, Reddy A, Keel A, Erb-Alvarez J, Teague H, Playford MP, Zhou W, Chen MY, Gelfand JM, Bluemke DA, Buckler A, Mehta NN. Treatment of Psoriasis With Biologic Therapy Is Associated With Improvement of Coronary Artery Plaque Lipid-Rich Necrotic Core: Results From a Prospective, Observational Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2020 Sep;13(9):e011199.
264. Papp K, Gottlieb AB, Naldi L, Pariser D, Ho V, Goyal K, Fakharzadeh S, Chevrier M, Calabro S, Langholff W, Krueger G. Safety Surveillance for Ustekinumab and Other Psoriasis Treatments From the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). *J Drugs Dermatol*. 2015 Jul;14(7):706-14.
265. Atalay S, van den Reek JMPA, van Vugt LJ, Otero ME, van de Kerkhof PCM, den Broeder AA, Kievit W, de Jong EMGJ. Tight controlled dose reduction of biologics in psoriasis patients with low disease activity: a randomized pragmatic non-inferiority trial. *BMC Dermatol*. 2017 May 8;17(1):6.
266. Lee WK, Kim BS. Effects of ustekinumab on systemic and vascular inflammation assessed by 18F-FDG PET/CT in Korean patients with moderate to severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(6 Suppl 1): AB110.
267. Coimbra S, Oliveira H, Reis F, Belo L, Rocha S, Quintanilha A, Figueiredo A, Teixeira F, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. C-reactive protein and leucocyte activation in psoriasis vulgaris according to severity and therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Jul;24(7):789-96.
268. Prodanovich S, Ma F, Taylor JR, Pezon C, Fasihi T, Kirsner RS. Methotrexate reduces incidence of vascular diseases in veterans with psoriasis or rheumatoid arthritis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:262-7.
269. Lan CC, Ko YC, Yu HS, Wu CS, Li WC, Lu YW, Chen YC, Chin YY, Yang YH, Chen GS. Methotrexate reduces the occurrence of cerebrovascular events among Taiwanese psoriatic patients: a nationwide population-based study. *Acta Derm Venereol*. 2012 Jul;92(4):349-52.
270. Balanescu AR, Bojinca VC, Bojinca M, Donisan T, Balanescu SM. Cardiovascular effects of methotrexate in immune-mediated inflammatory diseases. *Exp Ther Med*. 2019;17:1024-9.
271. Verhoeven F, Prati C, Chouk M, Demougeot C, Wendling D. Methotrexate and cardiovascular risk in rheumatic diseases: A comprehensive review. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021 Sep;14(9):1105-1112.
272. Dransfield I, Cabañas C, Barrett J, Hogg N. Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *J Cell Biol*. 1992 Mar;116(6):1527-35.

273. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2327-35.
274. Firestein GS, Bullough DA, Erion MD, Jimenez R, Ramirez-Weinhouse M, Barankiewicz J, Smith CW, Gruber HE, Mullane KM. Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins. *J Immunol*. 1995 Jan 1;154(1):326-34.
275. Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, Rao S, Edelman SD, Zhang H, Fernandez P, Cronstein BN, Chan ES. Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3675-83.
276. Sanz-Martínez MT, Moga E, Sánchez Martínez MA, Zamora Atenza C, Vidal S, Juárez C, Puig L. High Levels of Platelet-Lymphocyte Complexes in Patients with Psoriasis Are Associated with a Better Response to Anti-TNF- α Therapy. *J Invest Dermatol*. 2020 Jun;140(6):1176-1183.
277. Herster F, Bittner Z, Codrea MC, Archer NK, Heister M, Löffler MW, Heumos S, Wegner J, Businger R, Schindler M, Stegner D, Schäkel K, Grabbe S, Ghoreschi K, Miller LS, Weber ANR. Platelets Aggregate With Neutrophils and Promote Skin Pathology in Psoriasis. *Front Immunol*. 2019 Aug 16;10:1867.
278. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernán MA, Ridker PM, Mozaffarian D. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2011 Nov 1;108(9):1362-70.



Anexo

1. CONCENTRACIONES DÍMERO D.

La presencia de moléculas de DD sugiere coagulación intravascular porque solo puede generarse después de la formación de trombina y la subsiguiente fibrinólisis del coágulo, en la que la plasmina degrada la fibrina en sitios específicos generando entre sus fragmentos el DD²⁵⁸. Las mediciones del DD sirven como un marcador global de la activación de los sistemas de coagulación y fibrinolítico, y funcionan como un marcador indirecto de la actividad trombótica y trombolítica subsiguiente²⁵⁸. Debido a que el sistema hemostático está en equilibrio dinámico, el nivel plasmático de DD no es cero en la población normal, existe un valor detectable en sangre en la mayoría de los individuos normales.

1.1. Concentración dímero D en suero de ratón.

En el suero de ratón los valores de DD oscilaron entre 80 - 450 ng/mL. Los valores elevados eran esperados, ya que eran sujetos sometidos a cirugía, que es una de las causas que pueden aumentar la presencia de esta molécula. No observamos diferencias significativas en la concentración de DD en suero de los grupos (sano, psoriasis inducida naive, psoriasis inducida tratado con alguno de los anticuerpos monoclonales -adalimumab, secukinumab, ustekinumab).

Tabla 9. Concentración dímero D en suero de ratón.

GRUPO	SUERO RATONES								
	CONTROLES (SANOS)	PSORIASIS INDUCIDA							
		NAÏVE	ADA (4,4 mg/kg)	ADA (2,2 mg/kg)	SEC (2,1 mg/kg)	ETA (1,4 mg/kg)	INF (10 mg/kg)	UST (8,6 mg/kg)	UST (1,3 mg/kg)
Mínimo	82,36	271,2	248,9	375,9	332,7	292,7	325,3	415,5	373,8
Median	418,6	362,0	386,5	417,3	363,6	368,9	441,1	419,2	399,2
Máximo	458,7	416,9	390,0	443,2	438,0	451,5	495,8	422,9	424,6
Media	344,6	353,0	341,8	413,4	378,1	370,5	425,8	419,2	399,2
DE	176,1	61,73	80,45	28,13	54,13	74,75	75,24	5,268	35,96
EEM	88,05	30,87	46,45	14,06	31,25	37,37	37,62	3,725	25,42
ANOVA	P valor = 0,8571								
P value summary	ns								

ADA: adalimumab; DE: desviación estándar; EEM: error estándar de la media; ETA: etanercept; INF: infliximab; ns: no significativo; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab.

1.2. Concentración dímero D en plasma de pacientes psoriásicos.

Según el sistema de medición empleado, el valor predictivo positivo de DD en humanos era > 500 ng/mL. En el plasma de los pacientes y voluntarios sanos incluidos en el estudio los valores de DD oscilaron entre 1 - 280 ng/mL, valores considerados normales, y sin diferencias significativas entre grupos.

Tabla 10. Concentración dímero D en plasma de pacientes psoriásicos.

PLASMA HUMANOS					
GRUPO	CONTROLES (SANOS)	PSORIASIS			
		NAÏVE	ADA	SEC	UST
Mínimo	2,920	25,20	31,46	17,19	25,92
Median	79,55	112,3	71,18	60,72	69,15
Máximo	219,2	281,7	135,6	121,0	134,1
Media	95,96	132,9	78,84	62,73	74,58
DE	89,98	87,19	37,96	36,55	49,14
EEM	36,73	29,06	12,00	11,56	24,57
Kruskal-Wallis test	P valor = 0,3250				
P value summary	ns				

ADA: adalimumab; DE: desviación estándar; EEM: error estándar de la media; ns: no significativo; SEC: secukinumab; UST: ustekinumab.

2. TABLAS DE PRETRATAMIENTO FRENTE A POST-TRATAMIENTO.

Tabla 11. Diferencias en la cantidad de PMNs en fase de rodamiento antes y después del tratamiento con un fármaco biológico (gráficas en la Figura 45A).

x=18 semanas de tratamiento con un fármaco BIOLÓGICO				
Parámetro		RODAMIENTO PMN		
		Pretratamiento	Posttratamiento	Diferencia
N=9	Media	209,0	103,4	-105,6
	DE	142,3	108,3	87,52
	EEM	47,43	36,11	29,17
	Test no paramétrico pareado de Wilcoxon	P valor = 0,0078**		

** $p < 0.01$ frente a la mediana de rodamiento en los mismos sujetos a tiempo 0 (distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon) ($n = 9$). DS: desviación estándar; N: número de pacientes incluidos; EEM: error estándar de la media; PMN: célula polimorfonuclear; x: media.

Tabla 12. Diferencias en la velocidad de rodamiento de los PMNs antes y después del tratamiento con un fármaco biológico (gráficas en la Figura 45B).

x≈18 semanas de tratamiento con un fármaco BIOLÓGICO				
Parámetro		VELOCIDAD DE RODAMIENTO PMN		
		Pretratamiento	Postratamiento	Diferencia
N=9	Mediana	815,2	1120	305,1
	DE	258,0	288,7	328,3
	EEM	86,01	96,25	109,4
	Test no paramétrico pareado de Wilcoxon	P valor = 0,0273*		

*p<0.05 frente a la mediana de velocidad de rodamiento en los mismos sujetos a tiempo 0 (distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon) (n = 9). DS: desviación estándar; N: número de pacientes incluidos; EEM: error estándar de la media; PMN: célula polimorfonuclear; x: media.

Tabla 13. Diferencias en la cantidad de PMNs adheridos a la capa endotelial antes y después del tratamiento con un fármaco biológico (gráficas en la Figura 45C).

x≈18 semanas de tratamiento con un fármaco BIOLÓGICO				
Parámetro		ADHESIÓN PMN		
		Pretratamiento	Postratamiento	Diferencia
N=9	Mediana	4,323	5,770	1,447
	DE	4,859	4,056	6,953
	EEM	1,620	1,352	2,318
	Test no paramétrico pareado de Wilcoxon	P valor = 0,6250		

No hay diferencias p>0.05 frente a la mediana de adhesión en los mismos sujetos a tiempo 0 (distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon) (n = 9). DS: desviación estándar; N: número de pacientes incluidos; EEM: error estándar de la media; PMN: célula polimorfonuclear; x: media.

Tabla 14. Diferencias en la cantidad de PBMCs en fase de rodamiento antes y después del tratamiento con un fármaco biológico (gráficas en la Figura 46A).

x≈18 semanas de tratamiento con un fármaco BIOLÓGICO				
Parámetro		RODAMIENTO PBMC		
		Pretratamiento	Postratamiento	Diferencia
N=8	Media	72,88	41,00	-31,88
	DS	22,33	20,19	31,00
	EEM	7,893	7,139	10,96
	Test no paramétrico pareado de Wilcoxon	P-valor = 0,0234*		

*p<0.05 frente a la mediana de rodamiento en los mismos sujetos a tiempo 0 (en distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon) (n = 8). DS: desviación estándar; N: número de pacientes incluidos; EEM: error estándar de la media; PMN: célula polimorfonuclear; x: media.

Tabla 15. Diferencias en la velocidad de rodamiento de los PBMCs antes y después del tratamiento con un fármaco biológico (gráficas en la Figura 46B).

x≈18 semanas de tratamiento con un fármaco BIOLÓGICO				
Parámetro		VELOCIDAD DE RODAMIENTO PBMC		
		Pretratamiento	Postratamiento	Diferencia
N=8	Media	950,2	1257	307,3
	DS	363,6	148,4	350,9
	EEM	128,5	52,47	124,1
	Test no paramétrico pareado de Wilcoxon	P-valor = 0,0313*		

*p<0.05 frente a la mediana de velocidad de rodamiento en los mismos sujetos a tiempo 0 (en distribución no normal, test pareado no paramétrico de Wilcoxon) (n = 8). DS: desviación estándar; N: número de pacientes incluidos; EEM: error estándar de la media; PBMC, célula mononuclear de sangre periférica; x: media.

Tabla 16. Diferencias en la cantidad de PBMCs adheridos a la capa endotelial antes y después del tratamiento con un fármaco biológico (gráficas en la Figura 46C).

x≈18 semanas de tratamiento con un fármaco BIOLÓGICO				
Parámetro		ADHESIÓN PBMC		
		Pretratamiento	Postratamiento	Diferencia
N=8	Media	5,416	3,520	-1,896
	DS	5,179	2,573	5,235
	EEM	1,831	0,9096	1,851
	t-test pareado	P-valor = 0,3397		

No hay diferencias $p > 0.05$ frente a la media de adhesión en los mismos sujetos a tiempo 0 (distribución normal, t-test pareado paramétrico). DS: desviación estándar; N: número de pacientes incluidos; EEM: error estándar de la media; PBMC, célula mononuclear de sangre periférica; x: media.



Certificados



**DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA**



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00060

Vista la solicitud realizada en fecha **24/03/17** con nº reg. entrada **14255** por D/Dª. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

"Estudio del mecanismo de protección cardiovascular de fármacos biológicos"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00060** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Juan Vte Esplugues Mota/ Isabel Andújar Pérez**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por **Rodrigo Mianes Ribas** el
03/05/2017 11:57:39
GENERALITAT VALENCIANA

A/A.: Dr. Juan Vicente Esplugues (Farmacología), Dra. Almudena Mateu (Dermatología), y Dra. Isabel Andújar (Farmacia)

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 25 de Octubre de 2017 ha evaluado y ha aprobado el estudio titulado: Evaluación del efecto protector vascular de fármacos biológicos empleados en el tratamiento de la psoriasis.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados la Hoja de información al paciente, el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto.

Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio

Código de protocolo: FAR 02/2017

Código Ceic: 101/17

Valencia 27 de Octubre de 2017




Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

