



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACION

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN
DERMATOLOGÍA

ESTIMULACION DE CELULAS MONONUCLEARES EXPUESTAS A
COLAGENA I Y IV EN PACIENTES CON Y SIN PSORIASIS

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
CUASIEXPERIMENTAL

PRESENTADO POR: DRA. REGINA MALO JUVERA HERNANDEZ
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA

DIRECTORES DE TESIS: DR. FERMIN JURADO SANTA CRUZ
DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Estimulación de células mononucleares expuestas a
colágena I y IV en pacientes con y sin psoriasis**

Dra. Regina Malo Juvera Hernández

Vo. Bo.

**Dr. Fermín Jurado Santa Cruz
Profesor Titular del Curso de Especialización
en Dermatología**

Vo. Bo.

**Dr. Antonio Fraga Mouret
Director de Educación e Investigación**

INDICE

▪ Definición_____	3
▪ Epidemiología_____	3
▪ Clasificación_____	3
▪ Cuadro clínico_____	4
▪ Etiopatogenia_____	5
▪ Histopatología_____	6
▪ Factores desencadenantes_____	7
▪ Linfocitos y monocitos en psoriasis_____	8
▪ Citocinas y psoriasis_____	10
▪ Matriz extracelular_____	10
▪ PROTOCOLO DE ESTUDIO	
▪ Planteamiento del problema_____	12
▪ Justificación_____	13
▪ Hipótesis_____	13
▪ Objetivo general_____	13
▪ Objetivos específicos_____	14
▪ MATERIAL_____	14
▪ DISEÑO Y METODO	
▪ Diseño_____	15
▪ Población_____	15
▪ Muestra_____	15
▪ Criterios de inclusión_____	15
▪ Criterios de exclusión_____	16
▪ Criterios de eliminación_____	16
▪ Técnica_____	16
▪ Variables_____	17
▪ Plan estadístico_____	20
▪ Resultados_____	21
▪ Discusión_____	27
▪ Conclusiones_____	30

▪ Anexos_____	31
▪ Bibliografía_____	33

▪ **ANTECEDENTES:**

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria y crónica de la piel de severidad variable (2-6) que aún cuando no resulta mortal, afecta de forma importante la calidad de vida de los pacientes, involucrando un gran impacto económico(6-8).

Se estima que el 2% de la población en Europa y EUA padecen psoriasis con mayor prevalencia en países nórdicos. No se han registrado cambios importantes en cuanto a su incidencia en los últimos 20 años(1,9), En México se calcula que su incidencia es de 1.8% lo que la convierte en una de las 15 primeras causas de consulta dermatológica(10).

Esta enfermedad puede afectar hasta el 90% de la piel, uñas y en ocasiones articulaciones. A partir de la distribución y morfología de las lesiones esta enfermedad se clasifica de la siguiente manera:

1. Clasificación morfológica

- Psoriasis anular
 - Psoriasis circinada
 - Psoriasis folicular
 - Psoriasis generalizada
 - Psoriasis geográfica
 - Psoriasis gutata
 - Psoriasis *gyrata*
 - Psoriasis inversa
 - Psoriasis numular
 - Psoriasis pustular
 - Psoriasis serpinginosa
-

2. Clasificación clínica

- Pustulosa
 - Tipo Von Zumbusch
 - Pustulosis palmar y plantar
 - Acrodermatitis continua
 - Impétigo herpetiforme
 - Tipo anular
- No pustulosa
 - Vulgar de inicio temprano y tardío
 - Eritodérmica (45)

En cuanto a la topografía, ésta va a depender del tipo de psoriasis que se presente. En la forma en placas o vulgar, las superficies extensoras están afectadas principalmente a nivel de codos y rodillas, así como la región sacra, piel cabelluda y uñas. En contraste las lesiones pueden presentarse en pliegues como axilas e ingles dando la variedad conocida como psoriasis invertida(11). En todos los tipos de psoriasis podemos encontrar afección ungueal manifestada por onicolisis, pits, manchas en aceite y onicodistrofia, sin embargo existe una forma puramente ungueal en donde no se encuentran lesiones en piel(11).

Dentro del grupo de pacientes con psoriasis del 10 al 15% presentan afección de articulaciones periféricas o del esqueleto axial diagnosticándose así artritis psoriásica (AP)(9).

La forma clínica más común de la psoriasis es la variedad en placas denominándose incluso “psoriasis vulgar”, pues constituye más del 95% de los casos (12).

Este tipo de psoriasis suele presentar con lesiones simétricas y bilaterales que inician como pápulas y confluyen formando placas cubiertas por escama grisácea, que al ser removida provoca sangrado (signo de Auspitz); otro signo

característico es el fenómeno de Koebner, que corresponde a un fenómeno isomórfico que se produce por fricción o presión sobre la piel(11).

ETIOPATOGENIA

A pesar de los múltiples esfuerzos no se ha podido identificar a él o los agentes causales de la psoriasis.

Se ha postulado que puede existir un componente genético en la psoriasis(1-3,13) ya que tanto un inicio temprano como contar con antecedentes familiares de la enfermedad, se relaciona con una evolución más grave(2). Se ha determinado un *loci* de susceptibilidad para la psoriasis (PSORS1) localizado cerca de la región del HLA en el cromosoma 6(4) Al menos otros 9 genes se han relacionado con el desarrollo de psoriasis, dentro de ellos los más estudiados son 17q25 (PSORS2), 4q34 (PSORS3) y 1q21 (PSORS4)(3,14,14); los cuales se propone pudieran actuar de forma aditiva o sinérgica con PSORS1, sin embargo faltan estudios que demuestren esta teoría. Otros genes estudiados de forma reciente son el gen PSORS5 y ZNF313/RNF114(15).

Ahora bien, al analizar gemelos se encuentra un 67% de concordancia en monocigotos para el desarrollo de psoriasis y 18% en dicigotos, lo que sugiere un tipo de herencia multifactorial, con participación de factores ambientales(2), habiéndose incluso descrito algunos factores epigenéticos(16).

Entre los pacientes con psoriasis hay mayor morbilidad cardiovascular, probablemente relacionado con los incrementos en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) tisular, identificados en pacientes psoriásicos con eritrodermia (4,72+/-0,65) más que en aquellos con enfermedad diseminada (4,24+/-0,63) o en pacientes con lesiones únicas (3,47+/-0,48). Consecuentemente, los niveles de ECA disminuyen al disminuir la gravedad del cuadro clínico después del tratamiento(17,18). En otro estudio realizado por

Ludwig y cols se encontró una importante asociación entre psoriasis y calcificación arterial coronaria(19). Concordantemente, en un estudio realizado con 50 pacientes psoriásicos se evidencian incrementos en los niveles de colesterol, HDL y VLDL en estos pacientes respecto a sujetos control(20). En este mismo sentido, los pacientes con artritis psoriásica presentan mayor riesgo a padecer diabetes mellitus(21). Tanto diabetes, como la hiperlipidemia y la disfunción endotelial observada los pacientes psoriásicos(22), se relacionan directamente con estados proinflamatorios sistémicos.

Correspondientemente, los factores desencadenantes o “disparadores” de la psoriasis, como son estrés mecánico, infecciones y fármacos pueden resultar proinflamatorios(1,11,13).

Por otro lado, los cortes histológicos de piel psoriásica, muestran imágenes compatibles con inflamación crónica acompañando a los fenómenos de hiperqueratosis paraqueratósica, es decir que las células conservan el núcleo al llegar a la capa córnea, a diferencia de lo que se observa en la piel normal donde la capa córnea es menos gruesa y los queratinocitos pierden su núcleo al llegar a la capa más superficial de epidermis (FIG 1). Clásicamente la imagen de la capa córnea de las lesiones psoriásicas simula una red de canasta. Se observa asimismo gran cantidad de neutrófilos que presentan agranulosis en la epidermis. Los acúmulos de estos neutrófilos en la capa córnea se conocen en patología como microabscesos de Munro-Sabouraud y cuando se localizan en la en la capa espinosa, donde los neutrófilos se mezclan con linfocitos, se les denomina pústulas espongiiformes de Kogoj(1,23,24).

En la dermis papilar se observa dilatación marcada de vasos con infiltrado perivascular linfocitario que no se observa en piel normal. En estudios moleculares se ha determinado que localmente se encuentran citocinas que favorecen la angiogénesis como Interleucina 8 (IL8) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa)(25). Por otro lado el reclutamiento de linfocitos a dermis es

favorecido por la presencia del leucotrieno B4 y el factor activador de plaquetas(26).

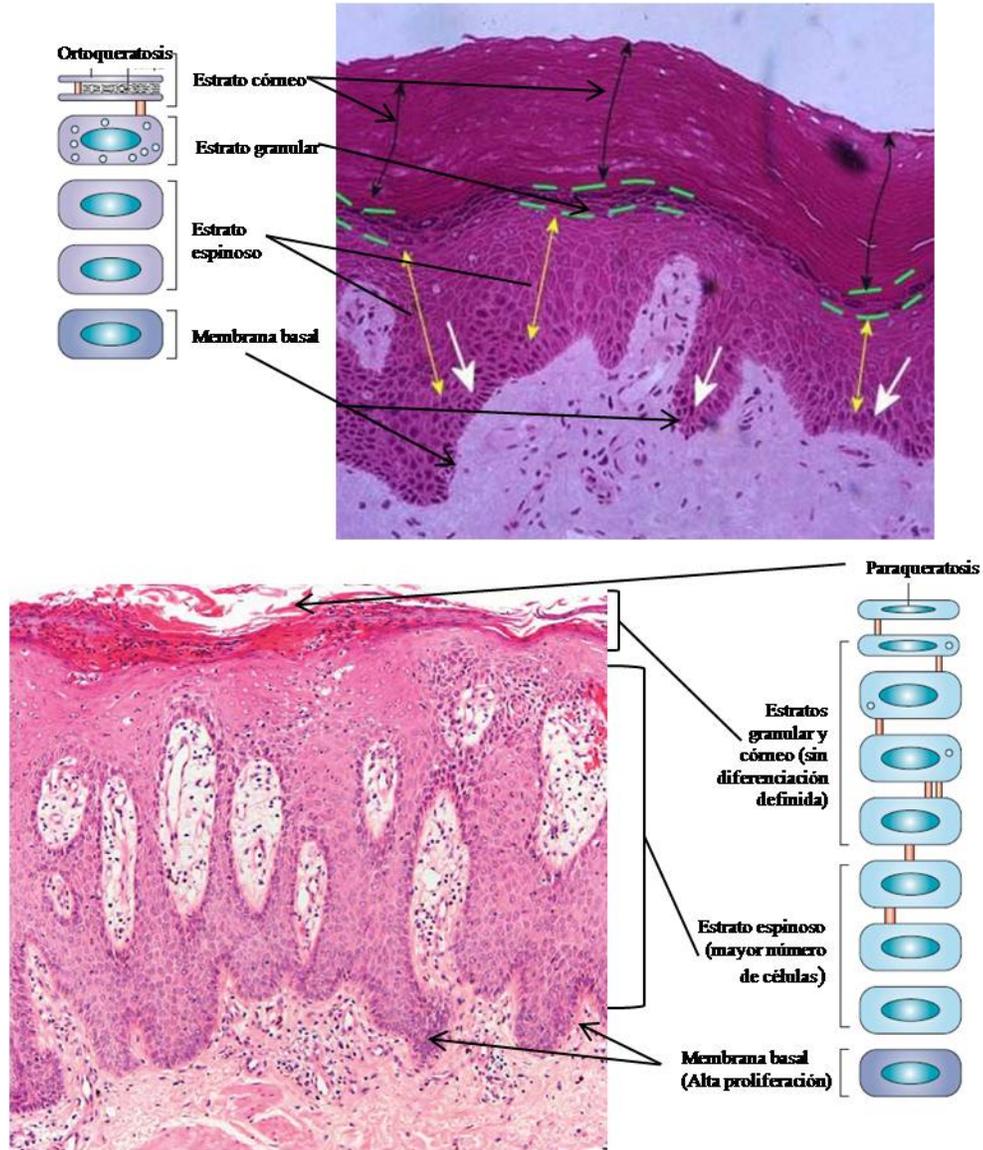


Figura 1. Diferencias entre los estratos dérmicos de piel sana y piel psoriásica. En los cortes histológicos de piel que se muestran, se observan las diferencias entre una piel sana (figura superior) y una piel psoriásica (figura inferior). En esta última claramente se observa el engrosamiento del estrato espinoso y granular, así como la presencia de queratinocitos con núcleo en el estrato córneo (paraqueratosis)1. Escala de la barra 200 μ m.

La participación de la respuesta inmunológica en el desarrollo de psoriasis también se sugiere porque en enfermedades inmunológicas como la enfermedad de Crohn la frecuencia es 5 veces más alta que en el resto de la población(1), sin embargo la causa de esta relación no está clara. Dado que en pacientes con VIH aumenta la incidencia de psoriasis, afectando a entre el 2% al 5% de estos pacientes, algunos autores proponen que la inmunodisregulación desencadenada por el virus puede desencadenar psoriasis en individuos genéticamente predispuestos por el alelo CW-060227 (42).

LINFOCITOS Y MONOCITOS EN LA PSORIASIS

Una de las propuestas más sólidas acerca del desarrollo de las placas psoriásicas, sugiere que ante un estímulo desencadenante, los queratinocitos y/o células inmunológicas residentes de piel se activan y liberan factores solubles, como citocinas y quimiocinas que atraen a otras células proinflamatorias que liberan citocinas y factores de crecimiento que favorecen la proliferación exacerbada de los queratinocitos(13,28).

El que los pacientes con psoriasis mejoren con la administración de ciclosporina confirma la participación de los linfocitos en la psoriasis(2). Wang y cols. estudiando un modelo murino de psoriasis que presenta CD18 hipomórfico (CD18/hyp) relacionan la cronicidad de la enfermedad con la presencia de linfocitos T CD4+ o cooperadores(29).

La activación de los monocitos y células dendríticas puede darse por el reconocimiento de moléculas como los patrones asociados a patógenos (PAMPs) a través de los receptores que reconocen PAMPs (PPRs) entre los que se encuentran los recientemente descritos receptores tipo Toll (TLRs)(30,31). Para que se lleve a cabo la activación del linfocito T es necesaria la identificación de antígenos (Ag) no especificados por células presentadoras de antígenos (CPA)(que incluye a células dendríticas y macrófagos) en dermis y

epidermis(2,13). Este proceso se lleva a cabo por medio de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Posteriormente las CPA migran al nodo linfático en donde se une a células T en reposo mediante la interacción de moléculas de superficie, para después presentar al Ag por medio del CMH y activar al linfocito T. La siguiente señal de activación es la interacción no dependiente de Ag (coestimulación), la cual es necesaria pues si no el linfocito T presenta apoptosis o no se activa. Hay autores que proponen que el estímulo antigénico en la psoriasis corresponde a un factor ambiental como partículas virales o bacterianas, medicamentos (litio, beta bloqueadores, antimaláricos, antiinflamatorios no esteroideos y supresión por el uso de esteroides) (11,13).

En la búsqueda del probable antígeno se ha estudiado el papel del estreptococo, principalmente en las formas clínicas de psoriasis en gotas(1,13) de hecho se han buscado reactividad cruzada de queratinocitos con proteína M del estreptococo poniendo énfasis en la inmunidad innata, sin resultados claros hasta el momento(1,19,32). La posibilidad de que un autoantígeno presente en la epidermis, probablemente un epítipo de la queratina sea el desencadenante, ha sido propuesto por los expertos, sin embargo no existen suficientes evidencias que apoyen esta hipótesis(1). Hay experimentos que demuestran la abundante distribución de células dendríticas (CD) en piel perilesional donde los cambios inflamatorios más tempranos ocurren, y sugieren la participación de los queratinocitos como desencadenantes de la inflamación(33). El papel de la CD es fundamental, incluso se sugiere que la falla de éste grupo celular puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias, entre ellas la psoriasis(34,35).

Ya sea entonces por la presencia de estímulos de la respuesta inmune adaptativa (antígenos) y/o de la respuesta inmune innata (ligandos de los TLRs), las células inmunes pertenecientes a ambos tipos de inmunidad, pueden liberar una gran cantidad de citocinas que no solo tendrá repercusiones sobre el sistema inmunológico, sino también hacia células como los queratinocitos(36).

CITOCINAS Y PSORIASIS

Al llegar a la piel, el linfocito T activado (sobre todo los de tipo cooperador Th) puede producir una serie de citocinas proinflamatorias, que resultan de gran importancia en las manifestaciones clínicas.. Tanto linfocitos CD4+ como CD8+ producen Interferón gamma (IFN-gama), interleucina (IL)-2, y TNF-alfa(37). Los macrófagos infiltrantes de piel pueden ser una importante fuente de esta última citocina(29).

El TNF-alfa puede contribuir al desarrollo de psoriasis al estimular la proliferación de queratinocitos al aumentar la producción de citocinas proinflamatorias por linfocitos T, macrófagos, células NK, y moléculas de adhesión endotelial(1,5,11,35). Incluso, la presencia del polimorfismo -238G>A - 308G>A que incrementa la transcripción del gen TNF-alfa, ha sido implicado como factor de riesgo para desarrollar psoriasis(38) Wang y cols encontraron que el mantenimiento de la lesión solo sucedía con el reclutamiento de macrófagos y la producción sostenida de TNF-alfa(39).

Por otro lado, la IL-2 estimula la proliferación de linfocitos-T, mientras que el IFN-gama es capaz de inhibir la apoptosis de queratinocitos al estimular la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x1,40. Esto explicaría en parte la acumulación de queratinocitos hacia las capas epidérmicas en psoriasis.

MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (MEC) es una red de proteínas que forman fibras y proveen así una red a la que se adhieren las células de los tejidos(41,42). Esta red puede establecer puntos de comunicación por contacto directo, además del

soporte que proporciona a las células. Se sabe que a través de la expresión en la superficie celular de moléculas como las integrinas se pueden regular directa o indirectamente actividades celulares como adhesión, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis(43).

Ahora bien, la matriz extracelular se compone por proteoglicanos y proteínas, primordialmente. De estas últimas, las más abundantes la constituyen las colágenas (80% de las proteínas totales de MEC). Los diferentes tipos de colágenas descritas, varían por las subunidades que las conforman, así como también por su distribución en los diferentes tejidos y la función que cumplen en ellos (Tabla 1).

Tipo	Función	Porcentaje de distribución en piel	Distribución en el organismo
I	Soporte	80-90%	Hueso, piel, tendones, ligamentos y cornea
III	Soporte	12%	Piel, vasos sanguíneos y órganos internos
IV	No se polimeriza en fibrillas, se orienta al azar	No determinado	Membrana basal de los tejidos, pared endotelial
V	Se intercala con colágenas I y III y se cree que regula el diámetro de las fibras	<5%	Piel, huesos, tendones, ligamentos y órganos internos
VI	Es polimorfa y adopta diferentes formas	No determinado	Piel
VII	Forma fibrillas de anclaje en la unión dermoepidérmica.	No determinado	Debajo del epitelio escamoso estratificado
XVII	Forma parte de los hemidesmosomas	No determinado	Forma parte de los hemidesmosomas

Tabla 1. Diferentes tipos de colágena y su función(44,45).

En piel, los tipos de colágena predominante corresponden a colágena I, II y IV.

Colágena I tiene una distribución preferencial en la dermis, mientras que colágena IV se encuentra tanto en la membrana basal de las células epidérmicas como en la periferia vascular. (44)

Cualquier célula que infiltra hacia piel desde la circulación sanguínea, deberá entonces entrar en contacto con estas colágenas y otras proteínas como fibronectina y laminina.

Hay que recordar que el estudio histológico de las lesiones psoriásicas revela la infiltración de diferentes células, que incluye a neutrófilos, macrófagos y linfocitos T CD4+ y CD8+(46). La mayoría de estas células expresan moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 lo que les permiten migrar hacia la dermis y epidermis(47). Interesantemente, entre estas células se ha identificado una mayor expresión de la molécula CD69, que se asocia con el fenotipo activado de macrófagos y linfocitos(48).

En el caso de la psoriasis, aunque se sabe que la fibronectina puede participar como agente co-estimulador del receptor de células T (TCR) (Camp et al) y que las células de pacientes con psoriasis producen mayor cantidad de la citocina proinflamatoria, TNF-alfa al estimularse inespecíficamente con fitohemaglutinina o ésteres de forbol, hasta el momento se desconoce si la exposición a componentes de matriz de las células que infiltran hacia la piel de sujetos psoriásicos favorece la generación respuestas inflamatorias por parte de estas células, lo cual se correlacionaría con la generación de las lesiones psoriásicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Múltiples estudios han buscado la presencia de autoanticuerpos, de antígenos en piel y la interacción de múltiples citocinas en el desarrollo de la

psoriasis. Sin embargo no ha quedado resuelto que moléculas son el desencadenante y cuales el producto. Por tal nos proponemos estudiar si componentes abundantes de la matriz extracelular pueden activar diferencialmente células mononucleares de individuos sanos y con psoriasis en placas. Con lo que se establecería si es que la interacción de las células con la matriz extracelular tienen algún papel en la psoriasis.

JUSTIFICACION

A pesar de la alta prevalencia de la psoriasis, es un campo todavía poco estudiado y aun no se ha determinado claramente la etiología ni ha sido posible identificar todas las moléculas implicadas en su etiopatogenia.

HIPOTESIS

Las células mononucleares de pacientes con psoriasis expuestas a colágena secretan más citocinas proinflamatorias que las células de sujetos sanos.

OBJETIVOS.

GENERAL:

- Determinar la activación de células mononucleares pacientes con y sin psoriasis al entrar en contacto con colágena y posterior al estímulo con LPS *in vitro*.
-

ESPECIFICOS:

- Cuantificar en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica expuestas o no a colágena I y IV y expuestas o no a LPS de pacientes con y sin psoriasis las citocinas TNF-alfa e IL-6.
- Determinar en la superficie celular el marcador de activación CD69 en las diferentes condiciones analizadas

MATERIAL

- 30 contenedores con heparina de litio (tubo para 10 cc con 87 unidades USP – 14.5 u/cc).
 - Placas de incubación de 24 pozos
 - Micropipetas
 - Colágena tipo I o IV
 - LPS
 - Anticuerpos anti CD4 humano
 - Anticuerpo anti CD8 humano
 - Anticuerpo anti CD69 humano (anti-CD69/PE, Caltag)
 - Solución fijadora (FLS, Becton Dickinson, San José, Ca, USA).
 - Solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4)
 - Centrifugador
 - citómetro Cyan de Dako (Dakocytomation, EUA)
-

MÉTODO Y TÉCNICAS

a) Diseño

Se realizará un estudio transversal y comparativo entre el grupo de pacientes con psoriasis y el grupo control.

b) Población

Pacientes que sean atendidos en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua del mes de Julio del 2007 a diciembre del mismo año.

c) Muestra

La muestra se obtendrá de todos los pacientes con diagnóstico clínico de psoriasis en placas que acudan a la consulta del el mes de julio a diciembre del 2007 y que firmen voluntariamente el consentimiento informado del estudio.

d) Criterios

Grupo Problema.

- De inclusión: Todo paciente con diagnóstico de psoriasis en placas de 18 a 50 años de edad que acuda a la consulta de dermatología en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua del mes de Julio del 2007 a diciembre del mismo año y que acepten firmar el consentimiento informado.
 - De exclusión: Pacientes que se encuentren bajo tratamiento con inmunomoduladores sistémicos en los últimos dos años, quienes presenten alguna enfermedad autoinmune y/o metabólica conocida o quienes hayan
-

presentado alguna infección el último mes. Aquellos en los que haya duda diagnóstica.

- De eliminación: Los pacientes a los que no pueda realizárseles personalmente una exploración física y aquellos que retiren su consentimiento.

Grupo Control

- De inclusión: Personas de 18 a 50 años de edad, sin enfermedades conocidas y que acepten firmar el consentimiento informado.
- De exclusión: Pacientes que se encuentren bajo tratamiento con inmunomoduladores sistémicos en los últimos dos años, quienes presenten alguna enfermedad autoinmune y/o metabólica conocida o quienes hayan presentado alguna infección el último mes.
- De eliminación: Los pacientes a los que no pueda realizárseles personalmente una exploración física y aquellos que retiren su consentimiento.

e) Técnica

Se realizó una exploración física completa de los pacientes que firmaron el consentimiento informado y cumplieron con los criterios de inclusión. (ANEXO1)

Se realizó un interrogatorio dirigido acerca de antecedentes personales patológicos. Los datos obtenidos durante el interrogatorio se anotaron en una hoja de recolección de datos donde además se anotaron las características topográficas y morfológicas de las dermatosis encontradas. (ANEXO2)

La hoja de recolección de datos incluyó las siguientes categorías:

- Sexo
- Edad del paciente
- Fecha de la revisión
- Número de registro
- Infecciones recientes
- Antecedentes heredofamiliares
- Edad de inicio de la psoriasis
- Enfermedades asociadas
- Medicamentos usados por más de un mes tópicos y sistémicos
- Otras dermatosis
- Topografía
- Tiempo de evolución del brote

A todos los pacientes del estudio se les tomó una muestra de sangre de 6 cc de sangre periférica, en condiciones asépticas en un contenedor con heparina de litio (tubo para 6 cc con 87 unidades USP – 14.5 u/cc).

Se extrajeron las células mononucleares en esterilidad, por la técnica de gradiente de Ficoll, a las cuales se les realizaron dos lavados con PBS (pH 7.4) estéril. El botón celular se resuspendió en medio RPMI a una concentración celular de 1×10^6 células/cc.

Esta suspensión celular se colocó en placas de incubación de 24 pozos, recubiertos o no con colágena tipo I o IV y se incubaron durante 12 hrs a 37°C, 80% de humedad y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, las células se expusieron a un conocido estímulo proinflamatorio, el LPS, a una concentración de 1 ug/mL. Se incubaron las células por 4 horas más.

Una vez terminado el tiempo de incubación total, se colectó el medio de cultivo de cada pozo, teniendo cuidado en eliminar todas las células en suspensión y almacenó a -70 °C para su posteriormente hacer la cuantificación de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6) por citometría de flujo con el sistema CBA (Cytokine Bead Array, Becton Dickinson, San Diego, Ca, USA) .

El concentrado celular se resuspendió en PBS estéril hasta alcanzar una densidad de 1×10^6 células/mL y se utilizó para examinar la expresión en superficie de CD69 en linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Para esto, se incubaron durante 15 min, 1×10^5 células con anticuerpos anti CD4 humano para la identificación de linfocitos T cooperadores, anti CD8 humano para la identificación de T citotóxicos y anti CD69 humano (anti-CD69/PE, Caltag); todos ellos a concentraciones de 1 uM. Pasado este tiempo de incubación se agregaron 250 uL de solución fijadora comercial a concentración 1x (FLS, Becton Dickinson, San José, Ca, USA). Se incubó durante otros 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se agregó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4) a cada tubo y se centrifugó a 382 g durante 5 min. El sobrenadante se retiró por decantación y las células se resuspendieron en 100 uL de PBS, para su posterior análisis utilizando un citómetro Cyan de Dako (Dakocytomation, EUA), con el software Summit v 2.0.

f) Variables del estudio

Variable (índice/indicador)	Tipo	Definición operacional	Escala de medición	Calificación	Fuente (Forma enérica)	Análisis/control
Sexo	Indep	Características fenotípicas y genotípicas de los individuos	Nominal	Masculino o femenino	Cuestionario	Porcentaje/estratificación
Edad	Indep	Tiempo que ha vivido una persona	Ordinal	Años	Cuestionario	Porcentaje/estratificación
Colágena IV	Indep	Estimulación de células mononucleares obtenidas de sangre periférica	De Razón	TNF-alfa IL-6 CD-69	Hoja recolección de datos	pg/ ml vs curva estándar
Colágena IV+LPS	Indep	Estimulación de células mononucleares obtenidas de sangre periférica	De Razón	TNF-alfa IL-6 CD-69	Hoja recolección de datos	pg/ ml vs curva estándar
Presencia de psoriasis	Dependiente	Persona con o sin evidencia clínica o histopatológica compatibles con la enfermedad	Nominal	Si No	Exploración Física	
Tiempo de inicio del brote	Indep	Tiempo de evolución desde que se presentó el último brote	Ordinal	Meses	Cuestionario	Porcentaje/estratificación
Topografía	Dependiente	Localización donde se presenta la dermatosis	Ordinal	Número de segmentos corporales afectados	Exploración Física	Porcentaje/estratificación

Análisis de la información

a) Recuento y tabulación de la información

El instrumento a utilizar fue una hoja de recolección de datos, misma que incluyó las siguientes categorías:

- Sexo
- Edad del paciente
- Fecha de la revisión
- Número de registro
- AHF
- Enfermedades asociadas
- Medicamentos usados por más de un mes
- Edad de inicio
- Tiempo transcurrido desde el inicio del último brote (en semanas)
- Otras dermatosis presentadas
- Topografía de las otras dermatosis
- Exploración física:
- Topografía

Posteriormente los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa (software) SPSS versión 11.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prueba de la Chi cuadrada se utilizó para determinar las diferencias en los promedios de la concentración tanto de TNF-alfa como de IL-6, así como de las células que expresan CD69 entre los diferentes estímulos y entre los grupos analizados. Un valor de $p < 0.05$ se interpretó como significativa.

Se realizó un análisis bivariado para buscar correlación entre la actividad de citocinas y las variables clínicas. Se utilizó una prueba de correlación de Spearman en búsqueda de asociación entre variables categóricas y las variables continuas que corresponden a los valores de TNF-alfa.

RESULTADOS

Grupo problema

Para el presente estudio se reclutaron 29 pacientes, 16 masculinos y 13 femeninos. Del grupo de problema, psoriasis, se reclutaron a 16 pacientes, de los cuales no se incluyó a una paciente femenina porque se encontraba ingiriendo antibióticos al momento de la entrevista y colección de muestra. Del grupo testigo o control, se reclutaron 13 sujetos. La distribución por edad y sexo de cada grupo se muestra en la Tabla 2.

	PSORIASIS N=15	CONTROLES N=13
EDAD	41 (22-50)	32 (23-49)
SEXO	8 H- 7M	8H 5M

Tabla 2. Datos demográficos de los sujetos estudiados. Se muestran los datos de edad y sexo de los sujetos pertenecientes a los dos grupos estudiados (Psoriasis y Controles)

EXPRESION DE CD69 EN LINFOCITOS

Se analizó la expresión del marcador de activación CD69 en la superficie celular de los linfocitos T CD4+ (cooperadores) y T CD8+ (citotóxicos), con el fin de observar si la exposición de estas células a las colágenas tipo I y IV, y su posterior estimulación con lipopolisacárido puede activar diferencialmente a

estas células dependiendo si provienen de sujetos sanos o de pacientes psoriásicos. Se encontró que los linfocitos T de pacientes con psoriasis presentan mayor capacidad de activación frente a los estímulos colágena y LPS con respecto a los linfocitos T de pacientes sanos.

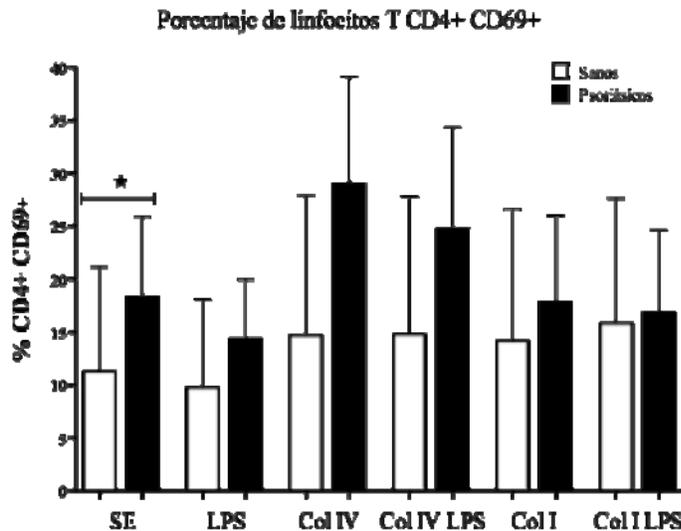


Figura 2. Porcentaje de linfocitos T cooperadores CD4+ con el marcador de superficie CD69+. Se muestran las proporciones de linfocitos T cooperadores CD4+ de sujetos sanos (□) y sujetos psoriásicos (■) que coexpresan el marcador de superficie CD69: SE: Testigo Sin Estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV/ LPS: Colágena tipo IV y Lipopolisacárido, Col I: Colágena tipo I y Col I/LPS: Colágena tipo I y Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística t de student modificada (Wilcoxon).

La población de linfocitos T CD4+ de pacientes con psoriasis presenta un mayor porcentaje de células T CD4+ CD69+ (Figura 2) que la de sujetos sanos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en las condiciones basales ($18.35 \pm 27.01\%$ vs. $11.29 \pm 26.1\%$, $p = 0.0475$). En las demás condiciones de estimulación se observa una clara tendencia en donde la expresión de CD69 en el grupo de casos es mayor que en sujetos sanos (LPS = 14.37 ± 20.21 vs. 9.757 ± 22.14 , Col I = 17.8 ± 29.63 vs. 14.17 ± 32.94 , Col I LPS = 16.83 ± 27.98 vs. 15.83 ± 31.25) predominando en el estímulo con Col IV y Col IV LPS con un incremento en la expresión del marcador de activación (Col

IV = 28.96 ± 36.63 vs. 14.71 ± 34.93 y Col IV LPS = 24.71 ± 34.82 vs. 14.77 ± 34.57).

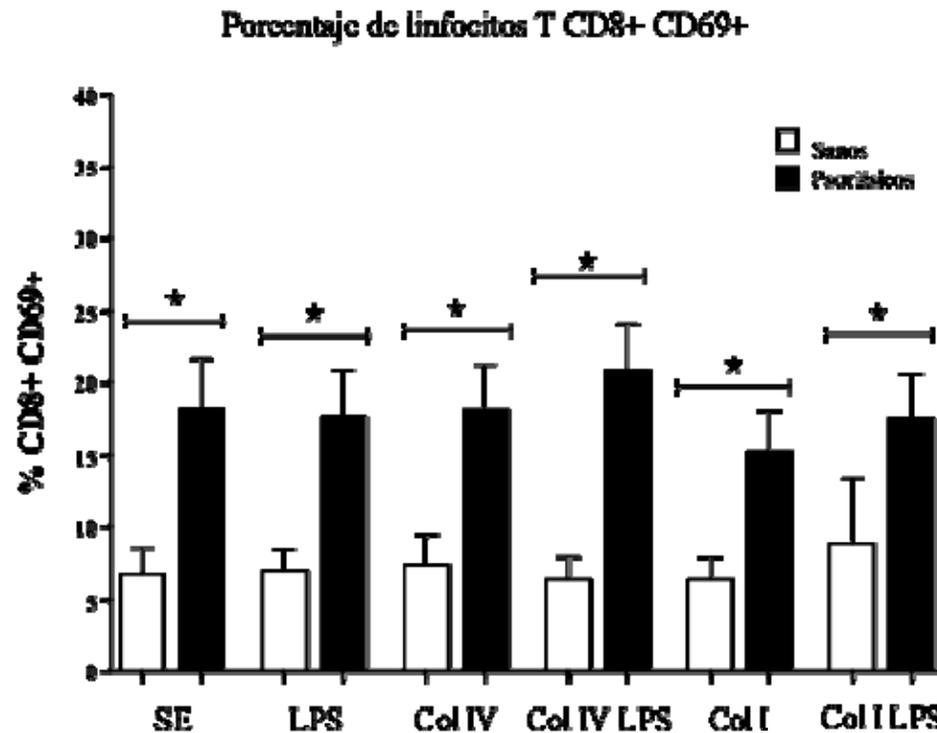


Figura 3. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos CD8+ con el marcador de superficie CD69+. Se muestran las proporciones de linfocitos T citotóxicos CD8+ de sujetos sanos (□) y sujetos psoriáticos (■) que coexpresan el marcador de superficie CD69: SE: Testigo Sin Estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV/ LPS: Colágena tipo IV y Lipopolisacárido, Col I: Colágena tipo I y Col I/LPS: Colágena tipo I y Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística t de student modificada (Wilcoxon).

Los linfocitos T citotóxicos CD8+ de pacientes con psoriasis coexpresaron CD69 en mayores proporciones que los linfocitos T CD8+ de sujetos sanos (Figura 3) y se encontraron valores estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) al comparar las diferentes condiciones de estimulación SE = 18.16 ± 12.59 vs. 6.8 ± 5.058 , $p = 0.0156$; LPS = 17.73 ± 11.52 vs. 7.038 ± 4.225 , $p = 0.0156$; Col IV =

18.11 ± 11.41 vs. 7.438 ± 5.714, p = 0.0234; Col IV LPS = 20.87 ± 12.04 vs. 6.4 ± 4.504, p = 0.0078; Col I = 15.28 ± 10.17 vs. 6.4 ± 4.351, p = 0.0078 y Col I LPS = 17.59 ± 11.01 vs. 8.912 ± 12.98, p = 0.0078.

SECRECIÓN DE IL-6 y TNF-alfa POR LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES CON Y SIN PSORIASIS

Se determinaron los niveles de IL-6 y TNF-alfa en el sobrenadante de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con y sin psoriasis mediante citometría de flujo utilizando el sistema CBA de captura de citocinas por perlas fluorescentes.

Producción de IL-6 por mononucleares de pacientes psoriásicos y sin psoriasis

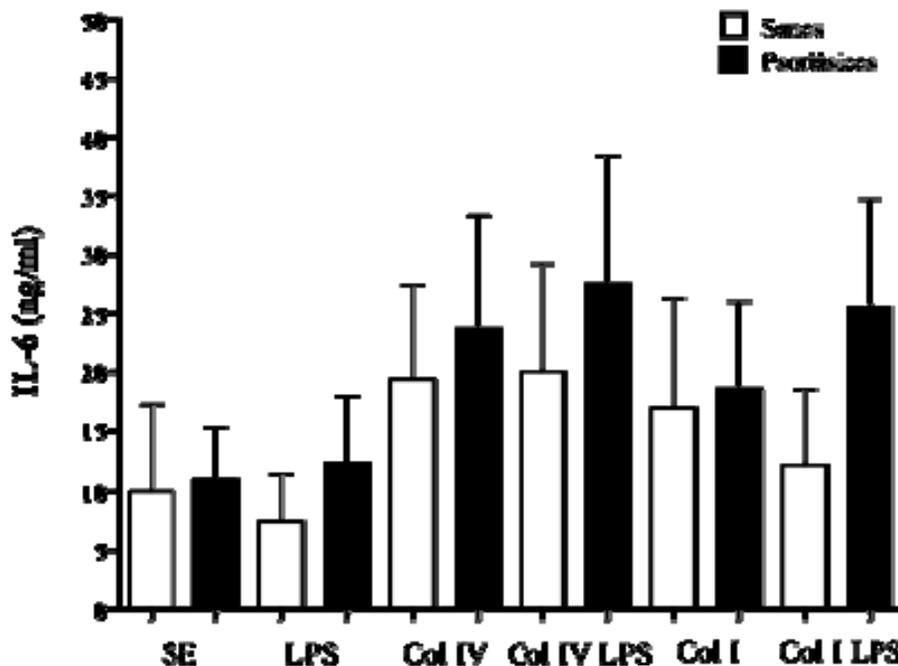


Figura 4. Producción de IL-6 por CMSPs de sujetos psoriásicos y no psoriásicos ante diferentes estímulos. Las concentraciones de IL-6 fueron determinadas en el sobrenadante de CMSP aisladas de sujetos no psoriásicos (□), n = 5, y sujetos psoriásicos (■), n = 5, que se sometieron a las diferentes condiciones de estimulación: SE: Testigo sin estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV/LPS: Colágena tipo IV y Lipopolisacárido, Col I: Colágena tipo I, Col I/LPS: Colágena tipo I y Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedios y el error estándar. Prueba estadística Mann Whitney

La concentración de IL-6 en células de pacientes con psoriasis fue mayor que en las células de sujetos sanos. En la figura 4 se observa la tendencia en donde la mayor concentración de IL-6 se produjo en las células estimuladas con Col IV (23.63 ± 29.17 ng vs. 19.33 ± 24.08 ng) Col IV LPS (27.45 ± 32.75 ng vs. 19.99 ± 27.68 ng) sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los estímulos.

Producción de TNF- α por mononucleares de pacientes psoriásicos y sin psoriasis

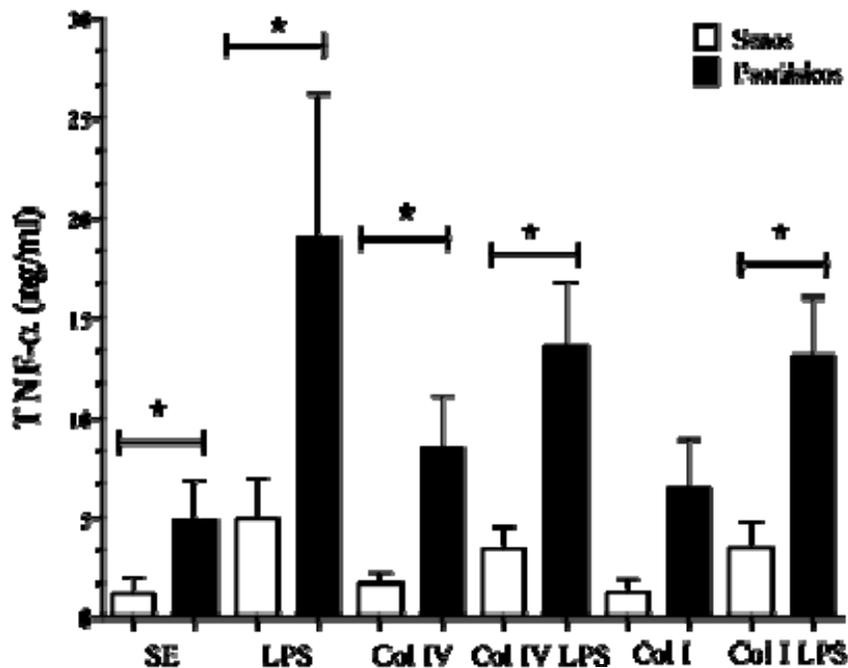


Figura 5. Producción de TNF- α por CMSPs de sujetos psoriásicos y no psoriásicos ante diferentes estímulos. Las concentraciones de TNF-alfa fueron determinadas en el sobrenadante de CMSP aisladas de sujetos no psoriásicos (\square), $n = 5$, y sujetos psoriásicos (\blacksquare), $n = 5$, que se sometieron a las diferentes condiciones de estimulación: SE: Testigo sin estímulo, LPS: Lipopolisacárido, Col IV: Colágena tipo IV, Col IV/LPS: Colágena tipo IV y Lipopolisacárido, Col I: Colágena tipo I, Col I/LPS: Colágena tipo I y Lipopolisacárido. Las barras representan los valores promedio y el error estándar. Prueba estadística Mann Whitnev

La concentración de TNF-alfa (Figura 5) al igual que la de IL-6 fue mayor en las células mononucleares de pacientes con psoriasis que en sujetos sanos inclusive desde condiciones basales (SE = 4.872 ± 6.087 ng vs. 1.153 ± 2.316 ng, $p = 0.0481$). El estímulo con LPS indujo la mayor producción de esta citocina

(LPS = 18.95 ± 24.18 ng vs. 4.947 ± 6.087 ng, $p = 0.0403$) en psoriásicos, en las demás condiciones las concentraciones de TNF-alfa producidas en Col IV y Col I fueron similares siempre los pacientes con psoriasis mayor a los sujetos sanos (Col IV = 8.493 ± 8.323 ng vs. 1.651 ± 1.721 ng, $p = 0.0227$ y Col I = 6.424 ± 8.295 ng vs. 1.241 ± 1.897 , $p = 0.1825$) y se incrementaron en presencia de LPS (Col IV LPS = 13.55 ± 10.52 ng vs. 3.403 ± 3.529 ng, $p = 0.0151$ y Col I LPS = 13.09 ± 9.691 ng vs. 3.441 ± 4.129 ng, $p = 0.005$).

Al comparar el estímulo basal de pacientes con psoriasis con los demás estímulos se encontraron diferencias significativas con el estímulo con lipopolisacárido ($p = 0.0303$), con Col IV LPS ($p = 0.0256$) y con Col I LPS ($p = 0.0181$). De la misma manera se encontró diferencia entre la estimulación con LPS y la estimulación con Col I ($p = 0.0285$) y la estimulación Col I contra Col I LPS ($p = 0.0503$).

En comparación en los sujetos sanos únicamente se encontraron diferencias al comparar el estímulo basal contra LPS ($p = 0.047$) y contra Col IV LPS ($p = 0.0503$).

Correlación de variables clínicas con valores de TNF-alfa

n 12	TNF	TNF con LPS	TNF con COL IV	TNF con COL IV y LPS	TNF con COL 1	TNF con COL I y LPS
Edad menor de 35 años	P 0.199	P 0.577	P 0.031	P 0.947*	P 0.746*	P 0.397
Tiempo de evolución menor a 36 meses	P 0.266	P 0.718*	P 0.004	P 0.505	P 0.954*	P 0.13
Género masculino	P 0.141	P 0.15	P 0.401	P 0.028	P 0.035	P 0.043

Figura 6. Correlación de los valores de TNF-alfa producido por CMSPs expuestas a diferentes estímulos en pacientes con psoriasis. Se realizó una análisis bivariado mediante la prueba de Spearman en donde $P > 0.7$ equivale a $p > 0.01$, $P > 0.7545$ equivale a $p > 0.005$ y $P > 0.836$ equivale a $p > 0.001$. Los valores marcados * se consideraron significativos.

A pesar de contar con 15 pacientes, lo cual consideramos una muestra insuficiente para valorar significancia clínica, correlacionamos los niveles de TNF-alfa obtenidos en las diferentes condiciones en el grupo de pacientes con psoriasis.

Encontramos que la edad menor a 35 años se asoció con la producción aumentada de TNF-alfa por CMN al ser estimuladas con Col IV+LPS y con COL I (P=0.947, P=0.746) respectivamente. Asimismo el tiempo de evolución de la enfermedad menor a 36 meses se asoció con la producción aumentada de TNF-alfa por CMN estimuladas con LPS y col I (P=0.718. P=0.954) respectivamente.

Discusión

En este trabajo evidenciamos que las células de sujetos psoriásicos tienden a incrementar la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF -alfa e IL-6 y aún más, que esta secreción puede modificarse ante el reconocimiento de colágena I, pero primordialmente colágena tipo IV. Previamente se había reportado que era factible que los componentes de matriz extracelular jugarán un papel dentro de la fisiopatología de la psoriasis, dado que los linfocitos de pacientes psoriásicos presentan, respecto a sujetos sanos, mayor expresión de la integrina alfa 1-beta 1, la cuál reconoce primordialmente a laminina, colágena I y IV. Desde el punto de vista funcional, en este mismo estudio, comprobaron que la inhibición de esta integrina con anticuerpos antagonistas, disminuye la expresión de IL-8 y la generación de paraqueratosis en las lesiones(49). Concordantemente nosotros observamos una tendencia a mayor producción de IL-6 y un incremento significativo de TNF-alfa por las células mononucleares, tanto de sujetos psoriásicos como sanos, en las células expuestas a colágena I ó IV, con respecto a células no expuestas previamente a colágena y estimulados con el estímulo proinflamatorio de LPS. Adicionalmente el que la producción de

estas citocinas proinflamatorias sea mayor en células de sujetos psoriásicos respecto a no psoriásicos, sugiere fuertemente que el reconocimiento de los componentes de matriz extracelular puede predisponer a las células mononucleares que infiltran piel en sujetos psoriásicos a generar más eficientemente respuestas proinflamatorias. Esto pudiera estar en relación directa con el desarrollo de las lesiones psoriásicas, ya que cualquier agente que funcione como disparador puede entonces liberar factores quimiotácticos que convoquen las células hacia piel; las células infiltrantes que respondan a estos factores quimiotácticos y entrar en contacto con los componentes de matriz, generarán una respuesta inflamatoria más exacerbada que sí se tratara de células que no entraron en contacto con componentes de matriz.

Así mismo, es factible que esta respuesta exacerbada a componentes de matriz se deba a una “predisposición” por parte de las células infiltrantes, favorecido, probablemente por el estado proinflamatorio sistémico que se sugiere existe en los sujetos psoriásicos(25).

Por otro lado, previamente se ha reportado que las células T de sangre periférica coexpresan marcadores de activación (CD69) y de infiltración celular (CD44, ICAM-1 y CCR5 pero no CD11b) además de elevarse los niveles de leucocitos totales (células T CD4+ y CD8+) y de secreción de citocinas proinflamatorias (TNF-alfa e INF-gamma) ante la existencia de estados proinflamatorios sistémicos, como obesidad y compromisos cardiovasculares(50). En este caso, es concordante que la mayor producción de citocinas por células de sujetos psoriásicos se relacione con una expresión incrementada de CD69 por los linfocitos analizados. Que en el caso de los linfocitos cooperadores (CD4+) este incremento de CD69 sea más evidente posterior a la exposición a colágena IV , también apoya el que el nivel de activación de los linfocitos infiltrantes puede modificarse por el reconocimiento de componentes de matriz.

La cuantificación de las citocinas por citometría de flujo representó un método rápido y práctico para la cuantificación sincrónica de diferentes citocinas, y determinar más claramente el perfil de citocinas prevalente.

La colágena tipo IV por sí sola generó cambios en la respuesta de las CMSP tanto en expresión de marcadores como en secreción de citocinas, participando activamente en la activación de células de proinflamatorias, principalmente en las células mononucleares totales y en las células T CD8+, las cuales participan activamente en la promoción de las lesiones psoriásicas. Aunque se desconocen los mecanismos por los cuales la colágena induce esta respuesta, existen propuestas como la del grupo de Roberts, A. I. et. al. en donde se realiza el reconocimiento de las colágenas vía integrina $\alpha 1\beta 1$; pero a pesar de esto, no se puede descartar la activación celular vía TCR por presentación de antígeno, pues se ha encontrado que este receptor se encuentra diferenciado hacia el reconocimiento de un cierto antígeno hasta ahora desconocido primordialmente en células T CD8+(51). Por tanto, la colágena tipo IV podría al ser reconocida vía integrinas y participar sinérgicamente en la activación celular por la presentación de antígeno, promoviendo la migración hacia la epidermis y la secreción de citocinas proinflamatorias contribuyendo en la formación de las lesiones psoriásicas y estimulando a los queratinocitos para su proliferación, y estos a su vez secretando citocinas proinflamatorias.

Es claro que existen una serie de eventos sucesivos que colaboran en la formación de las placas psoriásicas. En base a nuestros resultados y otros antecedentes, proponemos que es factible que las células de los pacientes con psoriasis se activen más que las células de sujetos normales por la interacción con proteínas de la matriz extracelular. Esto las vuelve susceptibles a desencadenar respuestas inflamatorias exacerbadas al sumarse un segundo evento, como podrían ser las infecciones locales, la activación endotelial o los traumatismos, que se han reconocido como disparadores de la psoriasis.

El que exista una correlación entre la edad de los pacientes (menor a 35 años) y la capacidad de secreción de TNF-alfa posterior a la estimulación con Col IV-LPS y colágena I probablemente se correlacione con el estado general del sistema inmunológico de los sujetos. Se sabe que el sistema inmunológico presenta una mejor capacidad de respuesta durante la tercera década de la vida, y va decayendo conforme se avanza en edad, al menos en lo referente a capacidad de producción de anticuerpos y de respuesta de células T citotóxicas (52). Es factible entonces que en estos pacientes “más jóvenes” se encuentre esta correlación positiva, debido a que la capacidad de producción de TNF-alfa es mayor.

Conclusión:

La exposición de células a colágena I y sobre todo a colágena IV favorece en estas la secreción de citocinas proinflamatorias ante el estímulo con LPS. Esta respuesta proinflamatoria es mucho mayor en el caso de las células de sujetos psoriásicos, lo que probablemente está involucrado en la generación de las placas psoriásicas.

ANEXO 1

Cuestionario

Folio_____

Fecha_____

Caso_____ Control_____

Expediente_____

Nombre_____

Edad_____

SOLO PARA SER LLENADO POR LOS CASOS

- Tiempo de evolución de la enfermedad_____
- Tiempo de evolución del brote_____
- Tratamientos en los últimos dos años_____
- ¿Ha presentado alguna infección en las últimas 6 semanas?_____
- ¿Ha tomado antibiótico en las últimas 6 semanas?_____
- ¿Toma algún medicamento?_____
- En caso afirmativo ¿Cuál?_____
- ¿Padece alguna otra enfermedad?_____
- En caso afirmativo ¿Cuál?_____

EXPLORACION FISICA

TOPOGRAFIA

- Cabeza_____
 - Tronco_____
 - MS_____
 - MI_____
-

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

MEXICO D.F A _____ DEL 2007.

Yo _____

_____ Por medio de la presente, manifiesto:

Que tengo conocimiento respecto a la naturaleza crónica e impredecible de mi enfermedad _____, la cual en la mayoría de las ocasiones requiere de tratamiento prolongado con posibilidad de recidiva.

Que se me ha informado sobre el protocolo de estudio que se lleva a cabo para poder esclarecer mejor la causa de mi enfermedad para lo cual es necesario tomar una muestra de sangre periférica.

Este procedimiento se lleva a cabo con aguja estéril, recolectando 6 ml de sangre mediante una punción de 21g de diámetro en la cara interna del brazo, la cual puede dejar una mancha temporal.

Con pleno consentimiento de lo anterior acepto voluntariamente y bajo mi estricta responsabilidad participar en el estudio "Respuesta de células mononucleares de sangre periférica de sujetos con psoriasis en placas y sin psoriasis expuestas a colágena tipo I y IV". Entiendo que del presente estudio se derivarán beneficios al ampliar el conocimiento sobre la patogenia de la psoriasis.

Deslindo a los investigadores de cualquier responsabilidad por secuelas o complicaciones derivadas de la toma de muestra y no especificada en este formato.

Así mismo es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que así lo desee conveniente y de solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en dicho estudio. En caso de que decida retirarme, la atención que recibo como paciente en esta institución no se verá afectada.

Firma del paciente o tutor

Firma de testigo

Firma del investigador

BIBLIOGRAFIA

1. Griffiths, C. E. and J. N. Barker. 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370:263-271.
 2. Krueger, G. and C. N. Ellis. 2005. Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J Am.Acad.Dermatol.* 53:S94-100.
 3. Bos, J. D. 2007. Psoriasis, innate immunity, and gene pools. *J Am.Acad.Dermatol.* 56:468-471.
 4. Koo, J., E. Lee, C. S. Lee, and M. Lebwohl. 2004. Psoriasis. *J Am.Acad.Dermatol.* 50:613-622.
 5. Bedini, C., F. Nasorri, G. Girolomoni, O. Pita, and A. Cavani. 2007. Antitumour necrosis factor-alpha chimeric antibody (infliximab) inhibits activation of skin-homing CD4+ and CD8+ T lymphocytes and impairs dendritic cell function. *Br.J Dermatol.* 157:249-258.
 6. Pirzada, S., Z. Tomi, and W. Gulliver. 2007. A review of biologic treatments for psoriasis with emphasis on infliximab. *Skin Therapy.Lett.* 12:1-4.
 7. Eghlileb, A. M., E. E. Davies, and A. Y. Finlay. 2007. Psoriasis has a major secondary impact on the lives of family members and partners. *Br.J Dermatol.* 156:1245-1250.
 8. Altobelli, E., M. Maccarone, R. Petrocelli, C. Marziliano, A. Giannetti, K. Peris, and S. Chimenti. 2007. Analysis of health care and actual needs of patients with psoriasis: a survey on the Italian population. *BMC.Public Health.* 7:59.
 9. Kane, D. and S. Pathare. 2005. Early psoriatic arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 31:641-657.
-

10.

PrFont34Bin0BinSub0Frac0Def1Margin0Margin0Jc1Indent1440Lim0Lim1
www.sedena.gob.mx/index.php?id=422 . 16-6-2008.

Ref Type: Electronic Citation

11. Luba, K. M. and D. L. Stulberg. 2006. Chronic plaque psoriasis. *Am.Fam.Physician.* 73:636-644.
 12. Alamanos, Y., P. V. Voulgari, and A. A. Drosos. 2008. Incidence and Prevalence of Psoriatic Arthritis: A Systematic Review. *J Rheumatol.*
 13. Gaspari, A. A. 2006. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J.Am.Acad.Dermatol.* 54:S67-S80.
 14. Guilhou, J. J. and J. P. Moles. 2008. New hypotheses in the genetics of psoriasis and other 'complex' diseases. *Dermatology* 216:87-92.
 15. Vasilopoulos, Y., K. Walters, M. J. Cork, G. W. Duff, G. S. Sagoo, and R. Tazi-Ahnini. 2008. Association analysis of the skin barrier gene cystatin A at the PSORS5 locus in psoriatic patients: evidence for interaction between PSORS1 and PSORS5. *Eur.J Hum.Genet.*
 16. Sonkoly, E., Z. Bata-Csorgo, A. Pivarcsi, H. Polyanka, A. Kenderessy-Szabo, G. Molnar, K. Szentpali, L. Bari, K. Megyeri, Y. Mandi, A. Dobozy, L. Kemeny, and M. Szell. 2005. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *J Biol.Chem.* 280:24159-24167.
 17. Mallbris, L., F. Granath, A. Hamsten, and M. Stahle. 2006. Psoriasis is associated with lipid abnormalities at the onset of skin disease. *J Am.Acad.Dermatol.* 54:614-621.
 18. Huskic, J. and F. Alendar. 2007. Tissue angiotensin-converting enzyme in patients with various clinical forms of psoriasis. *Bosn.J Basic Med.Sci.* 7:103-106.
-

19. Ludwig, R. J., C. Herzog, A. Rostock, F. R. Ochsendorf, T. M. Zollner, D. Thaci, R. Kaufmann, T. J. Vogl, and W. H. Boehncke. 2007. Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. *Br.J Dermatol.* 156:271-276.
 20. Akhyani, M., A. H. Ehsani, R. M. Robati, and A. M. Robati. 2007. The lipid profile in psoriasis: a controlled study. *J Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* 21:1330-1332.
 21. Tam, L. S., B. Tomlinson, T. T. Chu, M. Li, Y. Y. Leung, L. W. Kwok, T. K. Li, T. Yu, Y. E. Zhu, K. C. Wong, E. W. Kun, and E. K. Li. 2008. Cardiovascular risk profile of patients with psoriatic arthritis compared to controls--the role of inflammation. *Rheumatology.(Oxford)* 47:718-723.
 22. Gonzalez-Juanatey, C., J. Llorca, J. A. Miranda-Filloo, E. Amigo-Diaz, A. Testa, C. Garcia-Porrúa, J. Martín, and M. A. Gonzalez-Gay. 2007. Endothelial dysfunction in psoriatic arthritis patients without clinically evident cardiovascular disease or classic atherosclerosis risk factors. *Arthritis Rheum.* 57:287-293.
 23. Weedon D., S. G. *Piel patología.*, Vol. 1. España, pp. 65-67.
 24. McKee P., C. E. *Pathology of the skin with clinical correlation*, Vol. 1. EUA, p. 1865.
 25. Pietrzak, A. T., A. Zalewska, G. Chodorowska, D. Krasowska, A. Michalak-Stoma, P. Nockowski, P. Osemlak, T. Paszkowski, and J. M. Rolinski. 2008. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin.Chim.Acta* 394:7-21.
 26. Van Pelt, J. P., E. M. De Jong, M. M. Seijger, C. A. Van Hooijdonk, E. S. De Bakker, I. M. Van Vlijmen, G. L. Parker, P. E. Van Erp, and P. C. Van De Kerkhof. 1998. Investigation on a novel and specific leukotriene B4
-

- receptor antagonist in the treatment of stable plaque psoriasis. *Br.J Dermatol.* 139:396-402.
27. Dlova, N. C. and A. Mosam. 2006. Inflammatory noninfectious dermatoses of HIV. *Dermatol.Clin.* 24:439-48, vi.
 28. Chang, J. C., L. R. Smith, K. J. Froning, B. J. Schwabe, J. A. Laxer, L. L. Caralli, H. H. Kurland, M. A. Karasek, D. I. Wilkinson, D. J. Carlo, and . 1994. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:9282-9286.
 29. Wang, T. W., J. S. Sun, Y. C. Huang, H. C. Wu, L. T. Chen, and F. H. Lin. 2006. Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR. *Biomaterials* 27:5059-5068.
 30. Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin. 2007. [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med.Sci.(Paris)* 23:67-73.
 31. Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol* 40:845-859.
 32. Baker, B. S., D. W. Brown, V. A. Fischetti, J. M. Ovigne, W. Porter, A. Powles, and L. Fry. 2001. Skin T cell proliferative response to M protein and other cell wall and membrane proteins of group A streptococci in chronic plaque psoriasis. *Clin.Exp.Immunol.* 124:516-521.
 33. Komine, M., M. Karakawa, T. Takekoshi, N. Sakurai, Y. Minatani, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, A. Asahina, and K. Tamaki. 2007. Early inflammatory changes in the "perilesional skin" of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? *J Invest Dermatol.* 127:1915-1922.
 34. Manuel, S. L., S. Rahman, B. Wigdahl, Z. K. Khan, and P. Jain. 2007. Dendritic cells in autoimmune diseases and neuroinflammatory disorders. *Front Biosci.* 12:4315-35.:4315-4335.
-

35. Guttman-Yassky, E., M. A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J. A. Carucci, R. Bergman, and J. G. Krueger. 2007. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J Allergy Clin.Immunol.* 119:1210-1217.
 36. Miller, L. S., O. E. Sorensen, P. T. Liu, H. R. Jalian, D. Eshtiaghpour, B. E. Behmanesh, W. Chung, T. D. Starner, J. Kim, P. A. Sieling, T. Ganz, and R. L. Modlin. 2005. TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol* 174:6137-6143.
 37. Bos, J. D. *Skin Immune System: Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology.* CRC Press.
 38. Li, C., G. Wang, Y. Gao, L. Liu, and T. Gao. 2007. TNF-alpha gene promoter -238G>A and -308G>A polymorphisms alter risk of psoriasis vulgaris: a meta-analysis. *J Invest Dermatol.* 127:1886-1892.
 39. Banno, T., A. Gazel, and M. Blumenberg. 2004. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J.Biol.Chem.* 279:32633-32642.
 40. El Domyati, M., M. Barakat, R. Abdel-Razek, and A. T. El Din. 2007. Apoptosis, P53 and Bcl-2 expression in response to topical calcipotriol therapy for psoriasis. *Int.J Dermatol.* 46:468-474.
 41. Bosman, F. T. and I. Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J.Pathol.* 200:423-428.
 42. Tanzer, M. L. 2006. Current concepts of extracellular matrix. *J.Orthop.Sci.* 11:326-331.
 43. Adroque, H. E., J. Borillo, L. Torres, A. Kale, C. Zhou, D. Feig, J. Merszei, R. Johnson, and Y. H. Lou. 2007. Coincident activation of Th2 T cells with onset of the disease and differential expression of GRO-gamma in
-

- peripheral blood leukocytes in minimal change disease. *Am.J Nephrol.* 27:253-261.
44. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of The Cell.* Garland Science.
45. Fitzpatrick, T. B. *Dermatología en Medicina General.* Panamericana.
46. Bachelez, H. 2005. Immunopathogenesis of psoriasis: recent insights on the role of adaptive and innate immunity. *J Autoimmun.* 25 Suppl:69-73. Epub;2005 Nov 2.:69-73.
47. Bowcock, A. M. and J. G. Krueger. 2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat.Rev.Immunol.* 5:699-711.
48. Adroque, H. E., J. Borillo, L. Torres, A. Kale, C. Zhou, D. Feig, J. Merszei, R. Johnson, and Y. H. Lou. 2007. Coincident activation of Th2 T cells with onset of the disease and differential expression of GRO-gamma in peripheral blood leukocytes in minimal change disease. *Am.J Nephrol.* 27:253-261.
49. Conrad, C., O. Boyman, G. Tonel, A. Tun-Kyi, U. Laggner, F. A. de, V. Kotelianski, H. Gardner, and F. O. Nestle. 2007. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat.Med.* 13:836-842.
50. Guzik, T. J., N. E. Hoch, K. A. Brown, L. A. McCann, A. Rahman, S. Dikalov, J. Goronzy, C. Weyand, and D. G. Harrison. 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J.Exp.Med.* 204:2449-2460.
51. Roberts, A. I., R. E. Brolin, and E. C. Ebert. 1999. Integrin alpha1beta1 (VLA-1) mediates adhesion of activated intraepithelial lymphocytes to collagen. *Immunology* 97:679-685.
-

52. Zheng, B. Zhang, Y, He, H, Marinova, E, Switzer, K, Wansley, D, Mbawuiké, I, and Han, S. 2007. Rectification of age-associated deficiency in cytotoxic T cell response to Influenza A virus by immunization with immune complexes. *The Journal of Immunology*, 179:6153-6159