

ORIGINALES

Evaluación histológica e inmunohistoquímica secuencial de marcadores de proliferación y apoptosis durante el tratamiento de la psoriasis con anti-factor de necrosis tumoral α (infiximab)

C. Gómez-Mateo^a, S.P. Ávalos-Peralta^b, J.J. Ríos-Martín^a, A.M. Carrizosa-Esquivel^b, R. González-Cámpora^a y F. Camacho-Martínez^b

^aDepartamento de Anatomía Patológica. ^bDepartamento de Dermatología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.

Resumen. *Introducción y objetivos.* La psoriasis es una enfermedad inflamatoria cutánea de naturaleza inmunológica mediada por citoquinas de tipo Th1. El tratamiento con anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (infiximab) ha proporcionado respuestas clínicas significativas; sin embargo, los mecanismos implicados en la curación no están bien aclarados.

El objetivo del presente trabajo es evaluar las variaciones de la histología y en la expresión de marcadores de proliferación y apoptosis, en biopsias cutáneas secuenciales de pacientes con psoriasis tratados con infiximab.

Material y métodos. Se estudiaron biopsias de piel (sana y lesionada) de 3 pacientes afectados de psoriasis generalizada moderada-grave (índice de área y gravedad de la psoriasis [PASI]: 35 de media) tratados con infusiones por vía intravenosa de infiximab (5 mg/kg) en las semanas 0, 2 y 6. Las biopsias se realizaron en los días 0, 14 y 28, y fueron procesadas para estudio histológico convencional e inmunohistoquímico con marcadores de apoptosis -TP53, BCL-2 y anticaspasas 3 y 8- y de proliferación celular -Ki67-.

Resultados. El tratamiento con infiximab se asoció con una significativa mejoría clínica en los 3 pacientes (PASI medio: 21,6 a los 14 días y 13,9 a las 6 semanas), que se correlacionó con la desaparición progresiva de las lesiones histológicas, con disminución de la proliferación epidérmica. Sin embargo, no observamos imágenes de apoptosis ni obtuvimos positividad con los anticuerpos anticaspasas. La expresión de TP53 disminuyó a las 2 semanas del inicio del tratamiento, siendo similar a la piel normal a los 28 días.

Conclusiones. La respuesta clínica e histológica de la psoriasis con infiximab no se asoció a un incremento significativo en los marcadores de apoptosis evaluados.

Palabras clave: psoriasis, factor de necrosis tumoral α , histología, inmunohistoquímica, apoptosis.

SEQUENTIAL HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF PROLIFERATION AND APOPTOTIC MARKERS DURING TREATMENT OF PSORIASIS WITH ANTITUMOR NECROSIS FACTOR α (INFLIXIMAB)

Abstract. *Background and objectives.* Psoriasis is an inflammatory skin disease of immunologic nature that is mediated by T-helper-1 cytokines. Clinical response to treatment with antitumor necrosis factor (TNF) α antibodies (infiximab) has been significant; however, the mechanisms for clearance of lesions have not been elucidated. The aim of the present study was to assess variations in the histology and expression of proliferation and apoptotic markers in sequential skin biopsies of patients with psoriasis treated with infiximab.

Material and methods. We studied skin biopsies (of lesioned and healthy skin) from 3 patients with extensive moderate-to-severe psoriasis (mean psoriasis area and severity index [PASI] score, 35) treated with intravenous infiximab infusions (5 mg/kg) at weeks 0, 2, and 6. Biopsies were taken on days 0, 14, and 28, and were processed for conventional histological and immunohistochemical study. The apoptotic markers used were TP53, B-cell lymphoma 2 protein, anticaspase 3, and anticaspase 8. The cell proliferation marker used was Ki67.

Results. Treatment with infiximab was associated with a significant clinical improvement in 3 patients (mean PASI score, 21.6 at 14 days and 13.9 at 6 weeks), which correlated with the progressive disappearance of histological lesions with a decrease in epidermal proliferation. However,

Correspondencia:

Juan José Ríos Martín.
Departamento de Anatomía Patológica.
Hospital Universitario Virgen Macarena.
Avda. Dr. Fedriani, s/n.
41009 Sevilla. España.
jjrios@ono.com

Aceptado el 6 de octubre de 2008.

apoptosis was not observed, and the samples tested negative for anticaspase antibodies. Expression of TP53 decreased 2 weeks after starting treatment, and was similar to that in normal skin at 28 days.

Conclusions. Clinical and histological response of psoriasis to infiximab was not associated with a significant increase in the apoptotic markers assessed.

Key words: psoriasis, tumor necrosis factor α , histology, immunohistochemistry, apoptosis.

Introducción

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria cutánea de naturaleza inmunológica, aunque los mecanismos etiopatogénicos no son del todo conocidos^{1,2}. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es la principal citoquina implicada en su patogenia³, así las concentraciones séricas de TNF- α se correlacionan con la actividad de la enfermedad cutánea, y el uso de terapias con anticuerpos anti-TNF- α (infiximab) ha proporcionado respuestas clínicas significativas en pacientes con psoriasis moderada-grave^{4,5}. Sin embargo, los mecanismos íntimos implicados en la curación clínica no están bien aclarados. Además de la acción sobre la activación y proliferación de los linfocitos T al bloquear al TNF- α , es posible que el infiximab pueda también actuar sobre la susceptibilidad de los queratinocitos a la apoptosis. En este sentido se postula que los queratinocitos de la epidermis psoriásica tienen una resistencia anormal a sufrir este tipo de muerte celular⁶, lo que puede contribuir a la hiperplasia epidérmica (acantosis regular) característica de la histopatología de esta enfermedad.

El objetivo del presente trabajo es evaluar en biopsias secuenciales cutáneas de pacientes con psoriasis tratados con infiximab, las variaciones en la histología convencional y la expresión de marcadores de proliferación celular (Ki67) y apoptosis (TP53, BCL-2 y anticaspasas 3 y 8), con el fin de comprobar la importancia de estos mecanismos en los efectos terapéuticos del fármaco.

Material y métodos

Pacientes

El estudio fue realizado en 3 pacientes, 2 hombres y 1 mujer, de 41, 58 y 27 años de edad, respectivamente, con psoriasis generalizada moderada-grave, con pérdida de respuesta al tratamiento con fármacos sistémicos y fototerapia. Estos pacientes fueron tratados con infiximab en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. La evolución de la enfermedad desde el diagnóstico fue superior a 10 años; la puntuación del índice de área y gravedad de la psoriasis (PASI) fue de media 35, y la extensión de las lesiones al menos de un 50% de la superficie corporal.

Los tratamientos sistémicos y la fototerapia se suspendieron un mes antes del inicio de la administración de infiximab (Remicade® viales de 100 mg). La dosis utilizada fue de 5 mg/kg por vía intravenosa (IV) en las semanas 0, 2 y 6 (dosis de inducción) y posteriormente cada 8 semanas (dosis de mantenimiento). Los pacientes dieron su consentimiento para el inicio del tratamiento y la toma de biopsias.

Biopsias

Se realizaron biopsias en sacabocados (de 0,6 cm) de las lesiones cutáneas antes del tratamiento con infiximab (día 0), en el día 14 (previo a la infusión de la segunda semana) y en el día 28 del tratamiento con infiximab. Además, el día 0 se realizó una biopsia de piel normal, no afectada por la enfermedad. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4 micras de espesor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, según la técnica habitual.

Estudio inmunohistoquímico

Se realizó estudio inmunohistoquímico en cortes seriados de 4 micras de todas las muestras histológicas con los siguientes anticuerpos: TP53 (prediluido, Biomedica, USA), Ki67 (MIB-1, prediluido, Novocastra), BCL-2 (1:50, Dako), caspasa 3 (1:200, Novocastra) y caspasa 8 (1:200, Novocastra). Las técnicas de inmunoperoxidasa (complejo estreptoavidina-biotina) fueron realizadas con un sistema automatizado de inmunotinción (Ventana, Arizona, USA). Las secciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina diluida, y la valoración microscópica semicuantitativa de las tinciones fue realizada por 2 observadores (C. Gómez Mateo y J.J. Ríos Martín) cegados con respecto al paciente y momento de la biopsia. Se utilizaron secciones de ganglio linfático como control positivo de los marcadores utilizados.

TP53 es una proteína que induce el mecanismo de apoptosis, considerada como el «guardián del genoma». Las caspasas son proteínas claves en la transducción y ejecución de la señal de apoptosis, que pueden ser «iniciadoras» (caspasa 8) o «ejecutoras» (caspasa 3). BCL-2 es una proteína anti-apoptótica.



Figura 1. A. Paciente afectada de psoriasis generalizada moderada-grave. B. Resultado a los 14 días tras el tratamiento con infliximab.



Figura 2. Estudio histológico de la piel afectada en el día 0 (preinfusión de infliximab). A. Lesión histológica representativa de psoriasis vulgar (hematoxilina-eosina, $\times 200$). B. Inmunotinción con Ki67 de la epidermis, sobre todo a nivel basal (inmunoperoxidasa, $\times 200$). C. Inmunotinción con TP53 superior al 10% de queratinocitos (inmunoperoxidasa, $\times 400$).

Resultados

Estudio histológico

En paralelo con la respuesta clínica (los 3 pacientes experimentaron una mejoría significativa de las lesiones) (fig. 1A y B), las biopsias cutáneas revelaron una disminución progresiva de los rasgos histológicos característicos de la psoriasis (hiperplasia epidérmica regular, paraqueratosis, exocitosis de linfocitos y neutrófilos, dilatación vascular superficial e infiltrado inflamatorio linfocitario dérmico de localización perivascular superficial) desde el día 0 hasta el día 28 (figs. 2A, 3A y 4A). En el día 28 sólo existía discreta hiperplasia epidérmica con ortoqueratosis y mínimo infiltrado inflamatorio dérmico. No se observaron imágenes histológicas de apoptosis en la epidermis (disqueratosis) en ninguna de las muestras estudiadas.

Inmunotinción con Ki67

La inmunotinción con Ki67 fue intensamente positiva en los queratinocitos basales en las biopsias de piel lesionada antes del tratamiento (día 0), «dibujando» toda la hilera basal (fig. 2B). Se observó una discreta disminución de tinción

en el día 14 (fig. 3B), mientras que en el día 28 era manifiesta la disminución de la tasa de proliferación epidérmica, similar a la obtenida en las biopsias de piel normal (fig. 4B).

Inmunotinción con TP53

En las biopsias de piel normal (día 0) se observaron aislados queratinocitos con tinción nuclear (de uno a dos queratinocitos por campo de $\times 20$), mientras que en las biopsias de piel lesionada preinfusión de infliximab la expresión de TP53 se observaba en más de un 10% de células epidérmicas, sobre todo en los estratos más basales (fig. 2C). A los 14 días existía una disminución significativa de la tinción (menos del 5% de queratinocitos positivos) (fig. 3C), y a los 28 días la expresión inmunohistoquímica de TP53 era similar a la de la piel no lesionada (fig. 4C).

Inmunotinción con BCL-2

La inmunotinción con BCL-2 fue negativa en los queratinocitos de todas las muestras estudiadas. Sólo se obtuvo positividad en los citoplasmas de los melanocitos y en la celularidad linfoide.

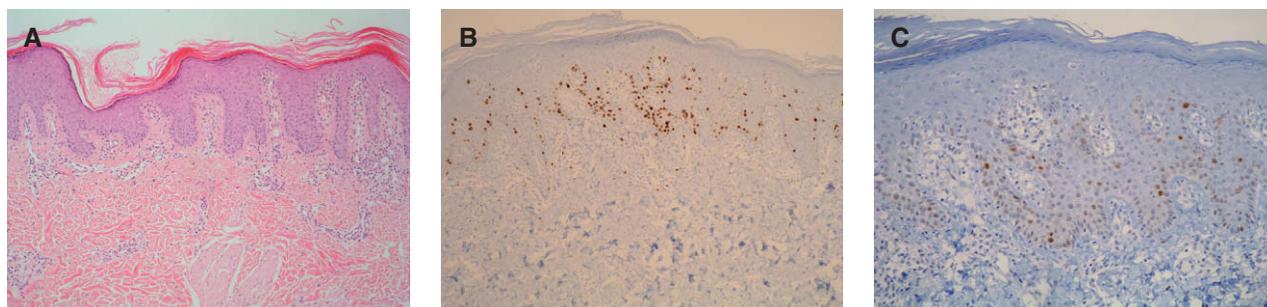


Figura 3. Estudio histológico en el día 14 de tratamiento. A. La sección histológica muestra una disminución de la hiperplasia epidérmica y del infiltrado inflamatorio, observándose paraqueratosis (hematoxilina-eosina, $\times 100$). B. Discreta disminución de la inmuntinción con Ki67 con relación al día 0 (inmunoperoxidasa, $\times 100$). C. Disminución de la inmuntinción con TP53 (menos del 5% de queratinocitos) (inmunoperoxidasa, $\times 200$).

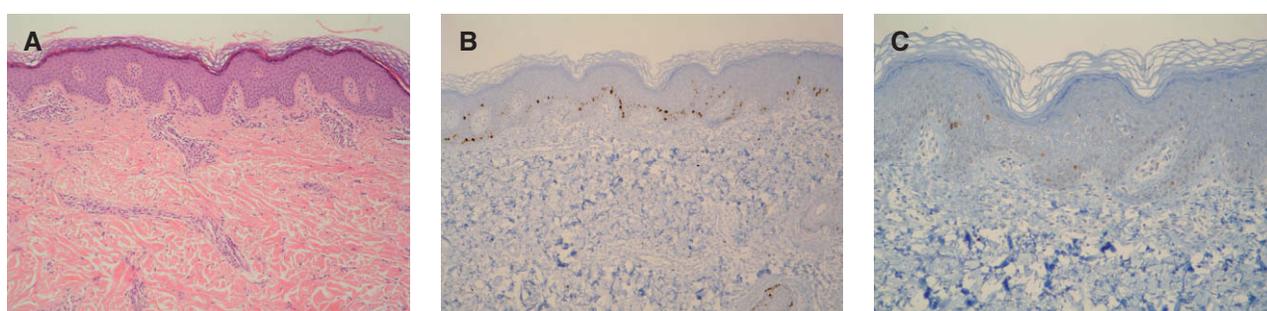


Figura 4. Estudio histológico en el día 28 de tratamiento. A. Desaparición de la hiperplasia epidérmica y queratinización normal (hematoxilina-eosina, $\times 100$). B. Disminución significativa de la inmuntinción con Ki67 (inmunoperoxidasa, $\times 100$). C. Inmuntinción con TP53 en queratinocitos aislados (inmunoperoxidasa, $\times 100$).

Inmuntinción con caspasa 3 y 8

No hemos obtenido inmuntinción con los anticuerpos anticaspasas 3 y 8 utilizados en ninguna de las muestras estudiadas, tanto de piel normal como lesionada.

Discusión

El tratamiento con anti-TNF- α ha demostrado ser beneficioso en pacientes con psoriasis moderada-grave⁴⁻⁵. En nuestro estudio hemos podido constatar mejoría clínica de las lesiones a los 14 días después de la primera infusión, con una reducción del PASI medio del 38%. Tras la segunda infusión la reducción del PASI medio fue del 60,28%. La mejoría, como se puede observar, fue rápida. Después de la tercera infusión (semana 6) dos de los pacientes presentaron una respuesta completa, con blanqueamiento de las lesiones. Las lesiones clínicas mejoraron en paralelo con el estudio histológico secuencial realizado.

En las muestras obtenidas a los 28 días de la primera infusión, los hallazgos morfológicos fueron inespecíficos y sólo se observaba discreto infiltrado linfocitario perivascular superficial y leve hiperplasia epidérmica irregular con ortoqueratosis. Por tanto, el bloqueo del TNF- α soluble provoca

una disminución de la inflamación cutánea y una normalización en el proceso de maduración de los queratinocitos.

Uno de los mecanismos implicados en la patogénesis de la psoriasis es la supresión de la apoptosis de los queratinocitos. En este sentido, se ha demostrado recientemente la participación de proteínas inhibitoras de apoptosis tales como survivina (realiza su acción inhibiendo la apoptosis mediada por la vía de las caspasas) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (factor de transcripción que regula diferentes genes implicados en la apoptosis)⁶. Además, los queratinocitos de la epidermis psoriásica parecen tener una resistencia anormal a sufrir este tipo de muerte celular⁷, y algunos autores han demostrado una expresión aberrante de moléculas relacionadas con la apoptosis⁸⁻¹⁰. Por ello, la expresión de TP53 en piel con psoriasis es probablemente consecuencia fisiológica de la hiperproliferación epitelial^{11,12} y no debe de ser interpretada como un incremento en el fenómeno de apoptosis.

Se ha postulado que la rápida respuesta a infiximab se debe, además de a los efectos antiinflamatorios, a un incremento en la apoptosis de los queratinocitos epidérmicos, como demostraron, valorando la expresión inmunohistoquímica de TP53 y microscopía electrónica, Krüger-Krasagakis et al¹³. En nuestro estudio las biopsias lesionales pretratamiento mostraron una tinción intensa en los que-

atinocitos basales con TP53, disminuyendo a los 14 días, probablemente en relación con la reducción de la proliferación celular inducida por el fármaco. No obstante, la inmunotinción a los 14 días era significativamente mayor a la observada en las biopsias de piel normal y en las biopsias realizadas a los 28 días. Por ello, es posible implicar al mecanismo de apoptosis de queratinocitos en la respuesta clínica e histológica de la psoriasis con infliximab, aunque no se asocie en nuestros casos a un incremento significativo de la inmunotinción con TP53, ni se hayan observado imágenes histológicas de células en apoptosis. Quizá la puesta en marcha de este mecanismo sea un suceso precoz en la resolución de las lesiones, ya que Krüger-Krasagakis et al¹³ demostraron un aumento de la expresión de TP53 en los queratinocitos en biopsias realizadas a los 5 días del inicio del tratamiento. En cualquier caso, en dicho mecanismo parece no estar implicada la vía de las caspasas, como también han demostrado estos autores¹³ para la caspasa 3.

Los resultados con Ki67 indican que la acción de infliximab ocasiona una disminución de la proliferación celular en la epidermis, que es significativa a partir de los 28 días (4 semanas). Similar conclusión obtuvieron El-Domyati et al¹⁴ estudiando la respuesta al tratamiento tópico de las lesiones de psoriasis con calcipotriol (análogo de la vitamina D₃); según estos autores, este fármaco inhibe la proliferación celular induciendo apoptosis por un mecanismo independiente de TP53, como el sistema Fas/Fas-L u otros miembros de la familia de BCL-2, de igual manera que podría suceder con la administración de infliximab, aunque nosotros no evidenciamos cuerpos apoptóticos en la epidermis psoriásica, ni antes ni tras el tratamiento.

La expresión de BCL-2 en lesiones de psoriasis parece no estar relacionada con la proliferación o la resistencia a la apoptosis. No obstante, los resultados con este anticuerpo son contradictorios. En algunos estudios se ha demostrado expresión inmunohistoquímica de BCL-2 en queratinocitos basales de piel normal y no en los de piel con psoriasis¹⁵. Otros autores han demostrado una disminución del ARNm de BCL-2 en la epidermis lesionada con relación a la normal⁸. Sin embargo, nuestros resultados con BCL-2 son similares a los descritos por Wrone-Smith et al¹⁶, con ausencia de expresión en la epidermis normal y patológica, si bien obtuvimos tinción en los linfocitos dérmicos e intraepidérmicos en las muestras de lesiones de psoriasis y a nivel de los melanocitos.

En conclusión, con la limitación de una serie descriptiva sobre 3 casos es evidente que el tratamiento de la psoriasis con infliximab normaliza la diferenciación de los queratinocitos, la proliferación y dilatación vascular y reduce la densidad del infiltrado inflamatorio dérmico, lo que conlleva una rápida mejoría clínica de los pacientes. Por el contrario, la implicación de la apoptosis en el mecanismo de acción de infliximab, a la luz de los resultados de la literatura y los propios, dista de estar bien establecida.

Conflicto de intereses

Declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdmars-son H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol.* 2004;135:1.
2. Pereira PR, Silva AS, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilla A, Teixeira F. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol.* 2004;150:917.
3. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards III CK. Biology of tumor necrosis factor- α -implications for psoriasis. *Exp Dermatol.* 2004;13:193-222.
4. Gamo R, López-Esteban JL. Terapia biológica y psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97:1-17.
5. Gottlieb AB, Evans R, Li S, Dooley LT, Guzzo CA, Baker D, et al. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:534-42.
6. Abdou AG, Hanout HM. Evaluation of survivin and NF-kappaB in psoriasis, an immunohistochemical study. *J Cutan Pathol.* 2008;35:445-51.
7. Laporte M, Galand P, Fokan D, de Graef C, Heenen M. Apoptosis in established and healing psoriasis. *Dermatology.* 2000;200:314-6.
8. Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci.* 2002;28:187-97.
9. Gündüz K, Demireli P, Vatanserver S, Inanir I. Examination of bcl-2 and p53 expressions and apoptotic index by TUNEL method in psoriasis. *J Cutan Pathol.* 2006;33:788-92.
10. Kawashima K, Doi H, Ito Y, Shibata MA, Yoshinaka R, Otsuki Y. Evaluation of cell death and proliferation in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci.* 2004;35:207-14.
11. Tadini G, Cerri A, Crosti L, Cattoretti G, Berti E. P53 and oncogenes expression in psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 1989;146:33-5.
12. Hannuksela-Svahn A, Paakko P, Autio P, Reunala T, Karvonen J, Vähäkangas K. Expressions of p53 protein before and after PUVA treatment in psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:195-9.
13. Krüger-Krasagakis S, Galanopoulos VK, Giannikaki L, Stefanidou M, Tosca AD. Programmed cell death of keratinocytes in infliximab-treated plaque-type psoriasis. *Br J Dermatol.* 2006;154:460-6.
14. El-Domyati M, Barakat M, Abdel-Razek R, El-Din Anbar T. Apoptosis, P53 and Bcl-2 expressions in response to topical calcipotriol therapy for psoriasis. *Int J Dermatol.* 2007;46:468-74.
15. Bianchi L, Faarace MG, Mini G, Piacentini M. Abnormal Bcl-2 and «tissue» transglutaminase expression in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1994;103:829-33.
16. Wrone-Smith T, Johnson T, Nelson B, Boise LH, Thompson CB, Núñez G, et al. Discordant expression of Bcl-xl and Bcl-2 by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo. *Am J Pathol.* 1995;146:1079-88.