

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

Facultad de Medicina

MODULACION FARMACOLOGICA Y DIETETICA DEL
METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO.
IMPLICACIONES EN LA PSORIASIS.

Memoria del trabajo realizado por Lluís Puig i Sanz para optar al grado de Doctor en Medicina bajo la dirección del Profesor José M. de Moragas, Director del Servei de Dermatologia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.



5 . RESULTADOS .

5.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FARMACOS INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA (PIRIPROST, LONAPALENE) SOBRE OTRAS VIAS DEL ACIDO ARAQUIDONICO ACTIVAS EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS Y DE PLAQUETAS.

Se efectuó un estudio para confirmar el efecto inhibitor de la vía de la 5-lipoxigenasa sobre suspensiones de PMN humanos por parte del piriprost y el lonapalene, que constituye la base de su acción farmacológica.

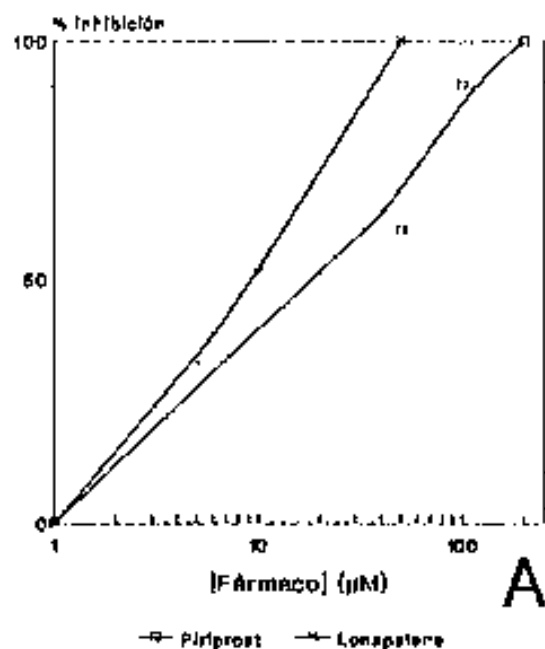
Con esta finalidad se procedió a incubar suspensiones de PMN procedentes de voluntarios sanos en presencia de 14C-AA 15 μ M y A23187 5 μ M, durante 5 minutos a 37°C. Para evaluar el posible efecto inhibitor de ambos fármacos sobre el metabolismo del AA exógeno por la vía de la 5-lipoxigenasa en los PMN humanos se empleó el mismo rango de concentraciones que determinan una inhibición del 50% sobre la vía de la ciclooxigenasa en las suspensiones de plaquetas.

La confirmación del mencionado efecto inhibitor se ilustra en la figura 5.1.1, que demuestra el porcentaje de inhibición con respecto al control de la síntesis de LTB₄ (A), productos de la oxidación del LTB₄ (B), 5-HETE (C) y suma de los productos de la 5-lipoxigenasa (D) por parte del piriprost (50 y 100 μ M) y el lonapalene (5, 10 y 50 μ M).

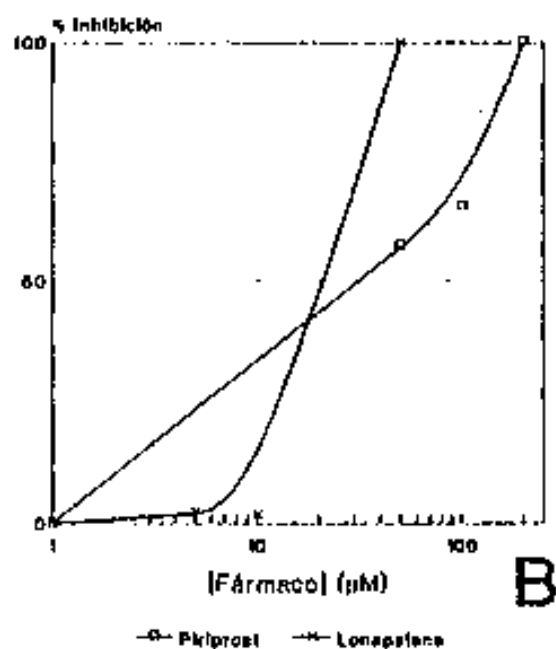
A partir de estos datos pueden estimarse los correspondientes IC50, que serían aproximadamente 50 μ M para el piriprost y 20 μ M para el lonapalene.

Otra serie de experimentos se destinó al estudio del efecto farmacológico del piriprost y el lonapalene sobre el metabolismo del AA exógeno en suspensiones de plaquetas.

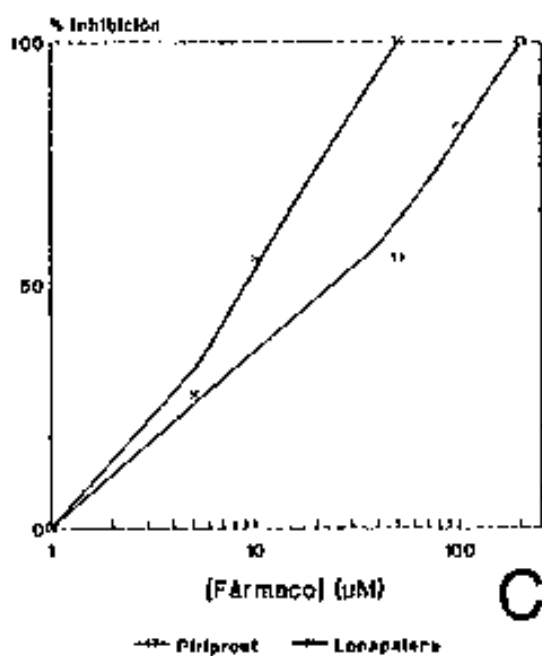
Síntesis LTB4 en PMN



Productos w-oxidación LTB4 en PMN



Síntesis 5-HETE en PMN



Actividad global 5-lipo en PMN

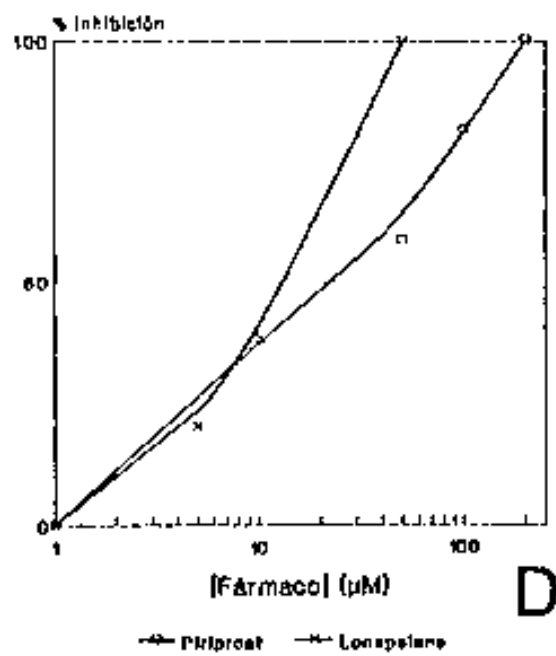


Fig. 5.1.1. Estudio del efecto del piriprostat y lonapalene sobre el metabolismo del AA exógeno en PMN.

El perfil metabólico típico de las plaquetas (Figura 5.1.2a)

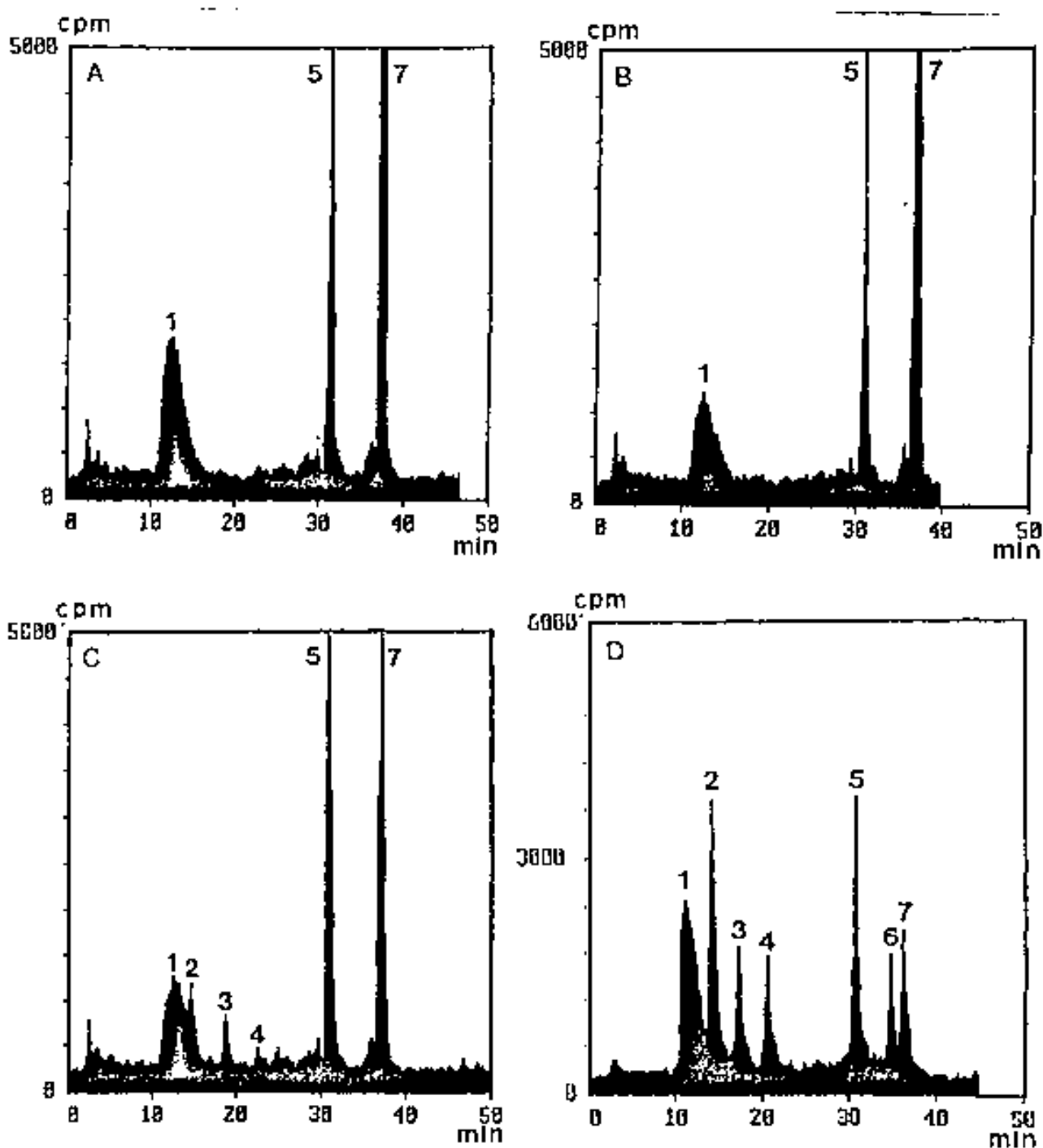


Fig. 5.1.2. Cromatogramas de: A) Plaquetas control; B) en presencia de lonapalene 10 μ M; C) en presencia de piroprost 100 μ M; D) patrones radiactivos: 1, TXB_2 ; 2, $\text{PGF}_2\alpha$; 3, PGE_2 ; 4, PGD_2 ; 5, HHT; 6, 15-HETE; y 7, 12-HETE.

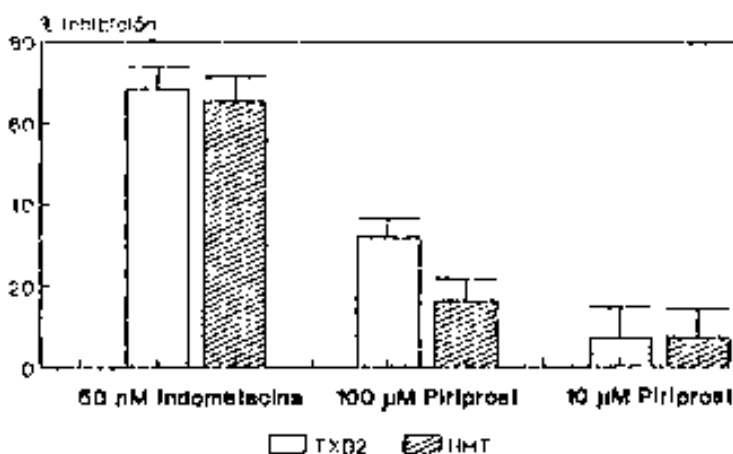
presentaba 3 picos principales que coeluyeron con TXB₂, HHT y 12-HETE. La figura 5.1.2b muestra un cromatograma obtenido incubando plaquetas en presencia de lonapalene 10 μM. La figura 5.1.2c muestra un cromatograma obtenido incubando plaquetas con ¹⁴C-AA 15 μM en presencia de piroprost 100 μM. En la figura 5.1.2d se representa el cromatograma correspondiente a los patrones radioactivos: 1, TXB₂; 2, PGF_{2α}; 3, PGE₂; 4, PGD₂; 5, HHT; 6, 15-HETE, y 7, 12-HETE.

Se observó una disminución de los productos de la actividad de la ciclooxigenasa (TXB₂ y HHT), aunque el perfil cromatográfico fue idéntico al de las plaquetas control. En cambio, al incubarse con piroprost 100 μM se produjo, además de una disminución del TXB₂, una desviación del metabolismo hacia la producción de otros metabolitos de la ciclooxigenasa, las PGF_{2α}, PGE₂ y PGD₂ (figura 5.1.2c).

En la figura 5.1.3 se representan los porcentajes de inhibición de la formación de TXB₂ y HHT causados por el piroprost (10 y 100 μM) y la indometacina (50 nM). El piroprost a la concentración de 100 μM produce una inhibición significativamente mayor (p < Fig. 5.1.3,

0.05) de la síntesis de TXB₂ que la de HHT (28.72 ± 3.99 y 14.42 ± 4.78 % respectivamente), lo cual no sucede con la indometacina que inhibe la

Porcentaje de inhibición
Piroprost-Indometacina



formación de ambos productos por igual.

Estos resultados, junto con el aumento de la producción de $\text{PGF}_2\alpha$, PGE_2 y PGD_2 (figura 5.1.2c), indican que el pírriprost, además de su efecto inhibitor de la 5-lipoxigenasa, actúa como un débil inhibitor de la tromboxano sintetasa y de la ciclooxigenasa.

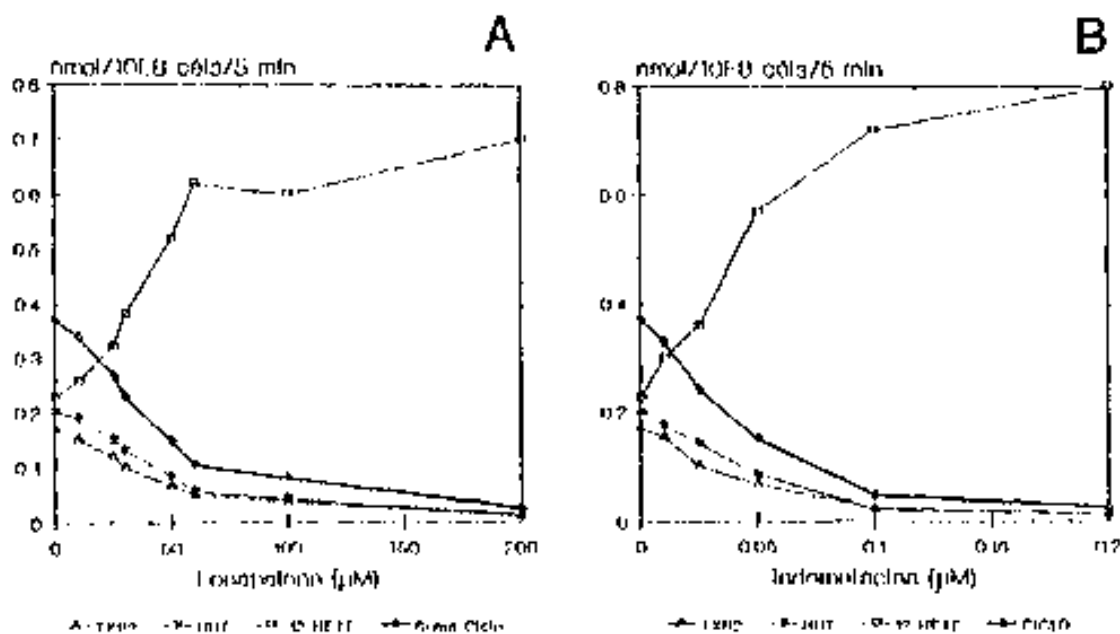


Fig. 5.1.4. Efecto de la concentración de ionopallene (a) o pírriprost (b) sobre el metabolismo plaquetar del AA.

En la figura 5.1.4 se muestra la producción de TXB_2 , HHT y 12-HETE por plaquetas tratadas con distintas concentraciones de ionopallene (A) o indometacina (B).

Se produjo una inhibición similar de la síntesis de TXB_2 y HHT, tanto con la indometacina como con el ionopallene, con un aumento similar en cuanto a la producción de 12-HETE. Cuando se efectuaron preincubaciones de las suspensiones de plaquetas durante 5 minutos en presencia de concentraciones de ionopallene superiores a 200 μM ,

la formación de TXB_2 y HHT por las plaquetas se inhibió completamente.

En las condiciones experimentales empleadas (preincubación con 15 μM de ácido ^{14}C -araquidónico a 37°C durante 5 minutos) las IC_{50} para la síntesis de TXB_2 fueron $37.8 \pm 6.7 \mu\text{M}$ para el lonapalene y de $44 \pm 7.1 \text{ nM}$ para la indometacina, y las IC_{50} con respecto a la producción de HHT fueron $36.9 \pm 7.3 \mu\text{M}$ para el lonapalene y $49 \pm 5.4 \text{ nM}$ para la indometacina, lo que indica que la potencia del lonapalene como inhibidor de la ciclooxigenasa es unas 1000 veces inferior a la de la indometacina.

El efecto de la concentración de ambos fármacos (indometacina y lonapalene) sobre la inhibición global de la ciclooxigenasa plaquetar, valorando la suma de todos los picos cromatográficos derivados de la actividad de este enzima, y sobre la síntesis de HHT y TXB_2 por separado, se representa en la Figura 5.1.5,

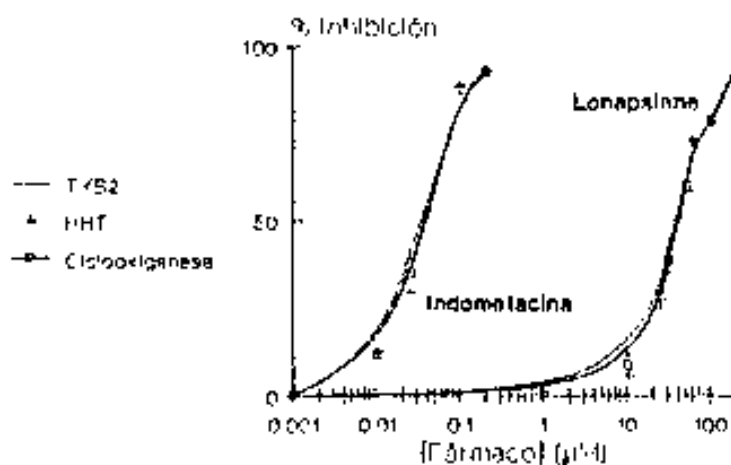


Fig. 5.1.5. Efecto de la concentración de indometacina o lonapalene sobre la ciclooxigenasa plaquetar.

que ilustra con claridad la diferencia de potencia entre ambos fármacos con respecto a la inhibición de la ciclooxigenasa.

En la figura 5.1.6 se representa la producción de 12-HETE (A) o su aumento relativo con respecto a los valores basales (B) en función del porcentaje promedio de inhibición de la síntesis de la suma de

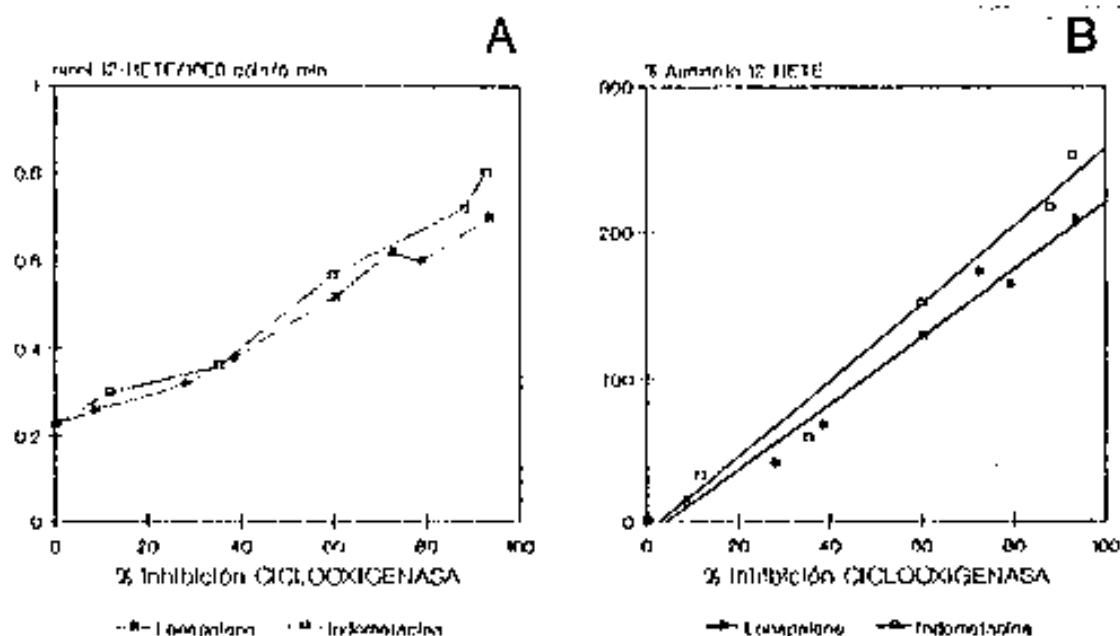


Fig. 5.1.6. Producción absoluta de 12-HETE (a) o incremento relativo de la misma respecto al control (b) en función de la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetar.

Todos los productos derivados de la actividad de la ciclooxigenasa, para cada concentración ensayada de lonapalene o indometacina. Existe una correlación lineal entre el porcentaje de inhibición de la ciclooxigenasa y la producción de 12-HETE. Las pendientes para el lonapalene y la indometacina fueron prácticamente idénticas. Extrapolando la proyección de la recta de regresión en el eje vertical, puede observarse que en una situación de completa inhibición farmacológica de la ciclooxigenasa, la producción de 12-HETE por las plaquetas se multiplicaría por 3.6 en el caso de la indometacina y por 3.2 en el caso del lonapalene. En algunos experimentos, la inhibición completa de la ciclooxigenasa plaquetar produjo aumentos de hasta 5 veces en la producción basal de 12-HETE.

La figura 5.1.7. muestra la dependencia de la inhibición de la producción de TXB₂ y HHT con respecto al tiempo de preincubación

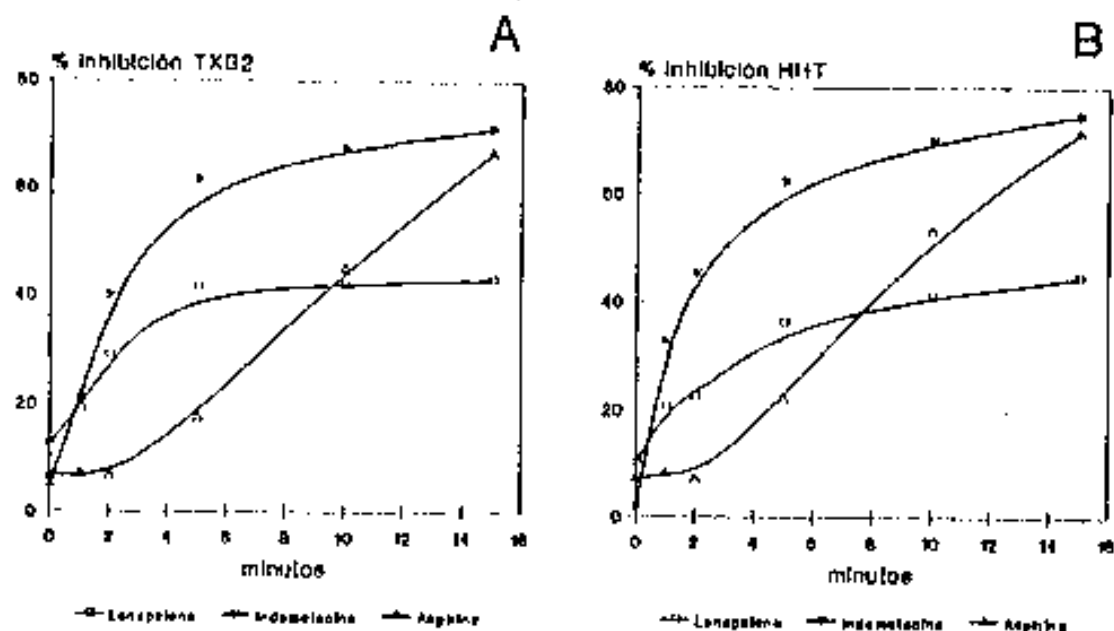


Fig. 5.1.7. Porcentaje de inhibición de la síntesis de HHT (A) y TXB₂ (B) en función del tiempo de preincubación en presencia de lonapalene 30 μM (círculos), indometacina 50 nM (cuadrados) o aspirina 10 μM (triángulos) (n = 3).

en presencia de lonapalene 30 μM, indometacina 50 nM o aspirina 10 μM. la curva de inhibición del lonapalene es similar a la de la indometacina, alcanzando una meseta hacia los 5 minutos de preincubación, mientras que en el caso de la aspirina (inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa por un mecanismo diferente) se observa una correlación lineal entre el grado de inhibición de la ciclooxigenasa y el tiempo de preincubación, siendo posible alcanzar una inhibición del 100% de la actividad de la ciclooxigenasa si se deja actuar la aspirina durante un período de tiempo suficiente. Empleando tiempos de preincubación de 7 a 9 minutos, se conseguiría una inhibición de la ciclooxigenasa similar (próxima al 40%) empleando 30 μM de lonapalene o 10 μM de aspirina.

En conclusión, estos resultados confirman que tanto el piroprost como el lonapalene son inhibidores de la actividad de la 5-

lipoxigenasa en los PMN humanos, siendo el primero algo menos potente en el modelo experimental empleado: a la concentración de 50 μM , el piroprost produce una inhibición del 60% sobre la actividad global de la lipoxigenasa, valorada como la suma de todos los productos de dicha vía metabólica en los PMN humanos, mientras que el lonapalene a la misma concentración produce una inhibición del 100%.

Por lo que respecta a la acción sobre el metabolismo del AA por las vías metabólicas presentes en las plaquetas y los queratinocitos humanos, que constituye el principal objetivo del presente estudio, los resultados se resumen a continuación.

El piroprost, a la concentración de 100 μM , presenta un débil efecto inhibitorio de la producción de TXB_2 (un 30%), similar al de lonapalene 10 μM . Sin embargo, en el caso del piroprost 100 μM , la inhibición de la tromboxano sintetasa (30%) es superior a la inhibición de la ciclooxigenasa (15%), lo que conlleva la derivación del metabolismo del AA hacia la síntesis de prostaglandinas, dando lugar a la formación de $\text{PGF}2\alpha$, $\text{PGE}2$ y trazas de $\text{PGD}2$, que no pueden observarse en el caso del lonapalene.

El lonapalene presenta asimismo actividad inhibitoria sobre la ciclooxigenasa a concentraciones altas, produciendo una derivación del metabolismo del AA exógeno hacia la síntesis de 12-HETE por la vía de la 12-lipoxigenasa. El efecto inhibitorio de la ciclooxigenasa de ambos fármacos puede modificar el perfil metabólico del AA en tipos celulares, tales como los queratinocitos, que posean simultáneamente actividad de la ciclooxigenasa y de la 5-lipoxigenasa, lo que debe tenerse en cuenta con vistas a su posible utilización terapéutica en la psoriasis.

5.2. IMIDAZOLES

5.2.1. EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRIMAZOL Y KETOCONAZOL SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

En la Figura 5.2.1.1 se muestra un radiocromatograma característico en el que se ilustran los picos obtenidos incubando PMN durante 5 minutos en presencia de ^{14}C -AA $15 \mu M$ y A23187 $5 \mu M$, correspondientes a 1) 6-trans- LTB_4 , 2) 6-trans,12-epi- LTB_4 , 3) LTB_4 y 4) 5-HETE. Cuando se emplea la técnica ilustrada (T1) los productos de la ω -oxidación del LTB_4 se eluyen conjuntamente con el frente de solvente.

En la figura 5.2.1.2 se ilustra el efecto inhibitor de las diferentes concentraciones ensayadas de bifonazol, clotrimazol y ketoconazol sobre la síntesis de: A) LTB_4 , B) productos de la ω -oxidación del LTB_4 ($20-OH-LTB_4$ + $20-COOH-LTB_4$), que se evaluaron sin resolver, C) 5-HETE y D) suma de los picos correspondientes a todos los productos de la 5-lipoxigenasa, que indica la actividad global inhibitoria de cada uno de los fármacos ensayados sobre dicho enzima. Puede observarse que los tres imidazoles ensayados presentaban una actividad

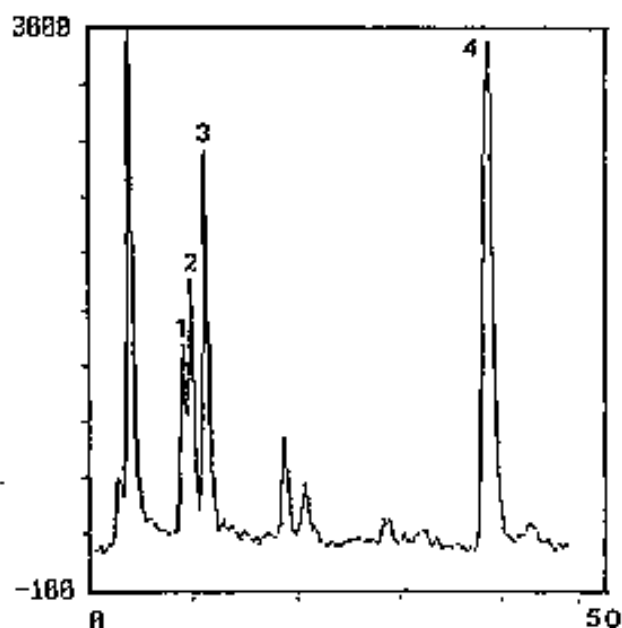


Fig. 5.2.1.1. Radiocromatograma obtenido incubando PMN durante 5 minutos en presencia de ^{14}C -AA $15 \mu M$ y A23187 $5 \mu M$. Técnica T1. 1) 6-trans- LTB_4 , 2) 6-trans,12-epi- LTB_4 , 3) LTB_4 y 4) 5-HETE.

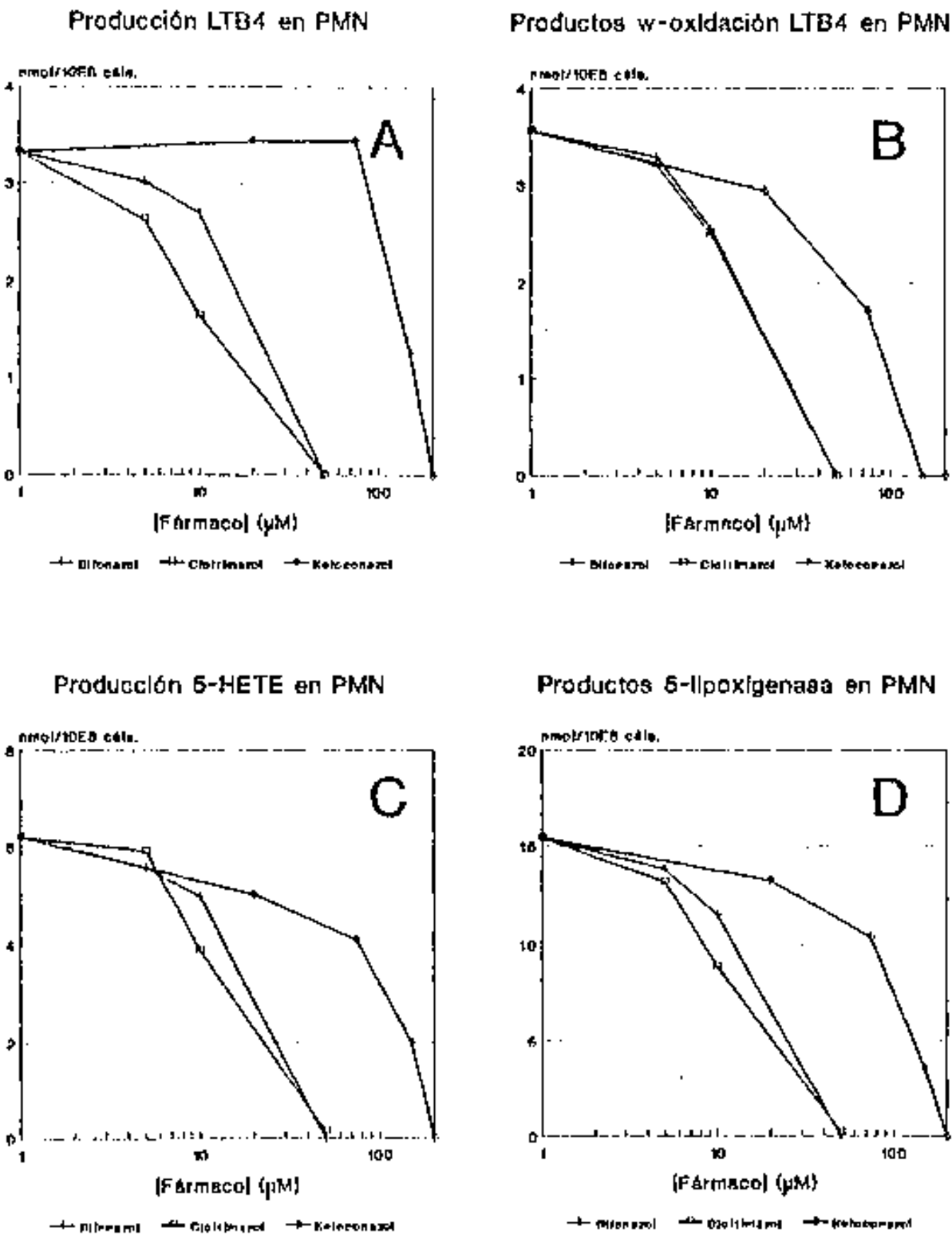
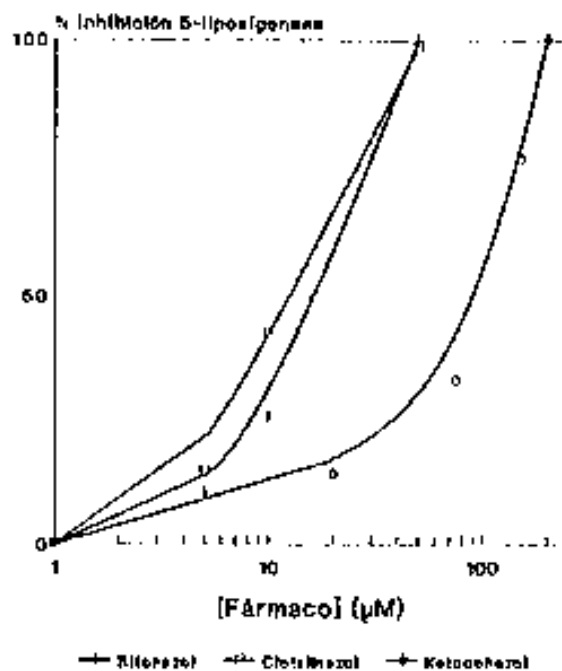


Fig. 5.2.1.2. Efecto imidazoles sobre metabolismo AA exógeno en PMN.

inhibitoria sobre la 5-lipoxygenasa, más potente en el caso del

bifonazol y del clotrimazol que en el del ketoconazol.

Productos 5-lipoxigenasa en PMN



AA 15 μM, A 23187.6 μM

Fig. 5.2.1.3. Porcentaje de inhibición de la 5-lipoxigenasa en PMN, en función de la concentración de cada fármaco.

En la figura 5.2.1.3 se representa el porcentaje de inhibición de la actividad de la 5-lipoxigenasa, evaluada como suma de las actividades de los picos correspondientes, en función de la concentración de cada uno de los fármacos. A partir de estos datos pudo calcularse la IC₅₀ de cada uno de los imidazoles con respecto a la actividad de la 5-lipoxigenasa:

Fármaco	IC ₅₀ ± SD (μM)
Bifonazol	23.07 ± 1.93
Clotrimazol	15.43 ± 3.10
Ketoconazol	105.50 ± 10.03

En base a estos datos, se observa que a igualdad de concentraciones, el ketoconazol es el inhibidor más débil de los tres imidazoles ensayados con respecto a la actividad de la 5-lipoxygenasa, siendo el clotrimazol y el bifonazol unas 7 y 4.5 veces más potentes, respectivamente.

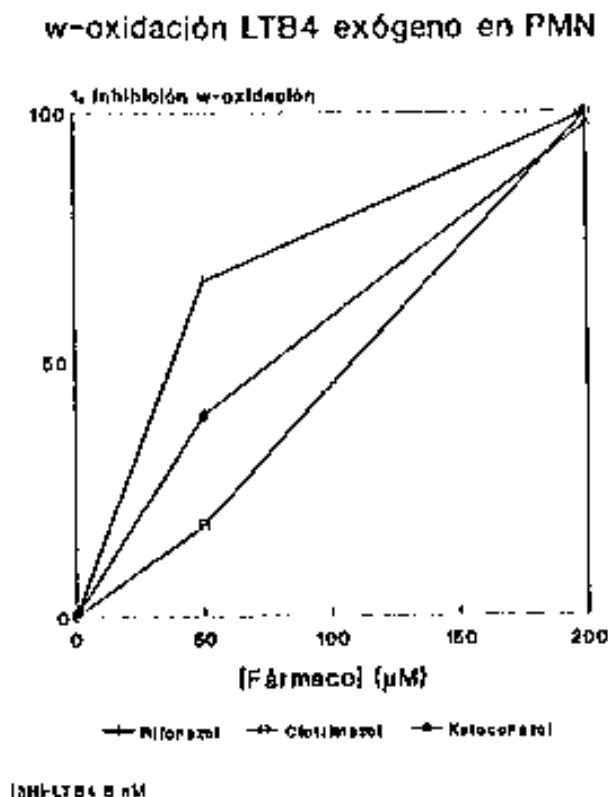


Fig. 5.2.1.4. Porcentaje de inhibición de la ω -oxidación del LTB₄ en PMN en función de la concentración de cada fármaco.

Los resultados del estudio del efecto inhibitor de la ω -oxidación del LTB₄ exógeno en PMN humanos por parte de los tres imidazoles ensayados se muestran en la figura 5.2.1.4. Como puede apreciarse, a la concentración de 200 μ M, los tres fármacos producen una inhibición del 100% en la ω -oxidación del LTB₄, mientras que a la concentración de 50 μ M, los fármacos empleados se pueden ordenar,

de acuerdo con su potencia, como sigue: Bifonazol (66.0 ± 14%) > Ketoconazol (39.31 ± 5.9%) > Clotrimazol (17.94 ± 9.6%).

5.2.2 EFECTO DEL BIFONAZOL, CLOTRINAZOL, Y KETOCONAZOL SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE PLAQUETAS.

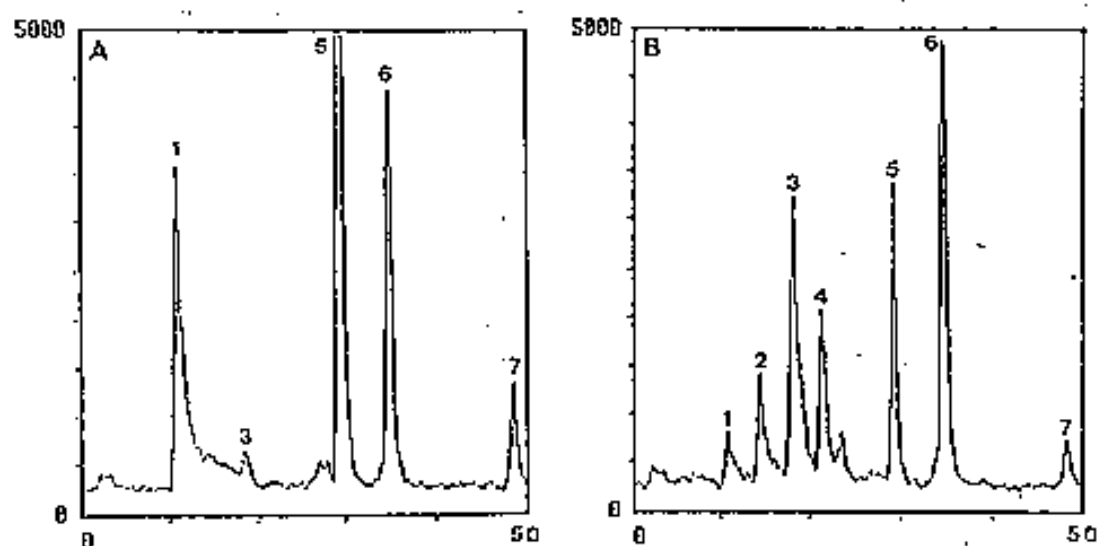


Fig. 5.2.2.1. Cromatograma obtenido incubando suspensiones de plaquetas humanas en presencia de $^{14}\text{C-AA}$ 15 μM , solo (A) o en presencia de bifonazol 10 μM (B). 1) TXB_2 , 2) PGF_{2a} , 3) PGE_2 , 4) PGD_2 , 5) HHT, 6) 12-HETE y 7) AA.

En la figura 5.2.2.1 se muestra un radio cromatograma característico en el que se ilustran los picos obtenidos incubando suspensiones de plaquetas humanas durante 5 minutos en presencia de $^{14}\text{C-AA}$ 15 μM , solo (A) o en presencia de bifonazol 10 μM (B), correspondientes a 1) TXB_2 , 2) PGF_{2a} , 3) PGE_2 , 4) PGD_2 , 5) HHT, 6) 12-HETE y 7) AA.

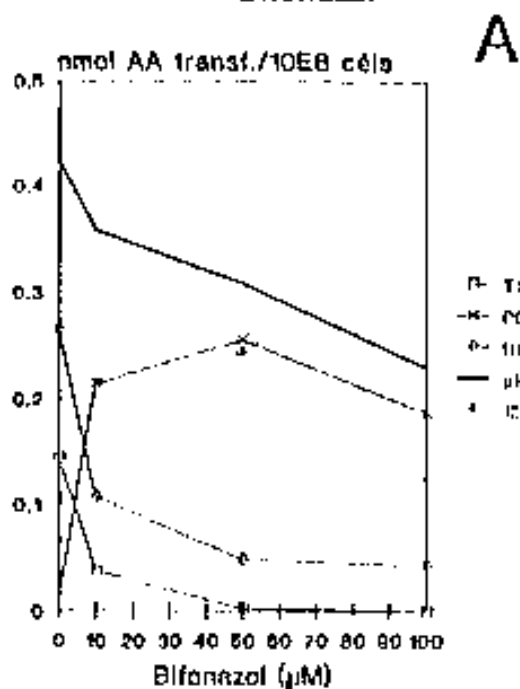
Los principales productos del metabolismo del AA detectado en las muestras de control fueron TXB₂, HHT y 12-HETE.

Cuando las suspensiones de plaquetas se incubaron en presencia de diversas concentraciones de los diferentes imidazoles, se obtuvieron cromatogramas semejantes al que se ilustra en (B), pudiéndose observar la producción de las prostaglandinas PGF_{2α}, PGE₂ y PGD₂, además de TXB₂ y HHT, como productos de la ciclooxigenasa.

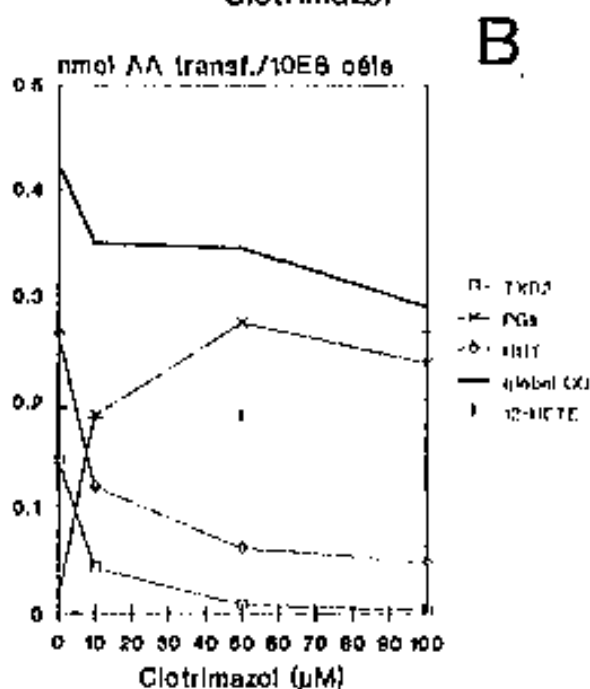
Todos los fármacos estudiados presentaron una actividad inhibitoria dual sobre la tromboxano sintetasa y sobre la ciclooxigenasa, siendo más intensa la inhibición de la primera vía metabólica.

En la figura 5.2.2.2 se muestra la producción de los diversos eicosanoides por plaquetas tratadas con distintas concentraciones de bifonazol (A), clotrimazol (B) o ketoconazol (C).

Síntesis eicosanoides x plaquetas
Bifonazol



Síntesis eicosanoides x plaquetas
Clotrimazol



Síntesis eicosanoides x plaquetas
Ketoconazol

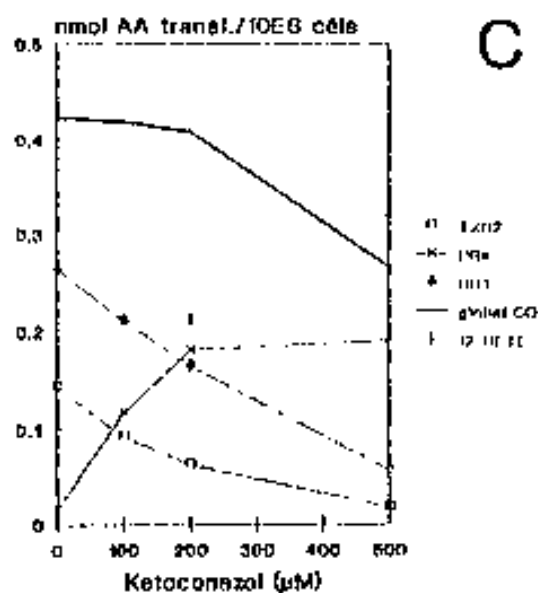


Fig. 5.2.2.2. Efecto de la concentración de bifonazol (a), clotrimazol (b) o ketoconazol (c) sobre la síntesis de eicosanoides en suspensiones de plaquetas humanas incubadas en presencia de ¹⁴C-AA 15 μM durante 5 minutos a 37°C.

El efecto de cada uno de los imidazoles ensayados, en función de la concentración, sobre el metabolismo plaquetar del AA exógeno por la vía de la ciclooxigenasa y la tromboxano sintetasa se ilustra en la figura 5.2.2.3.

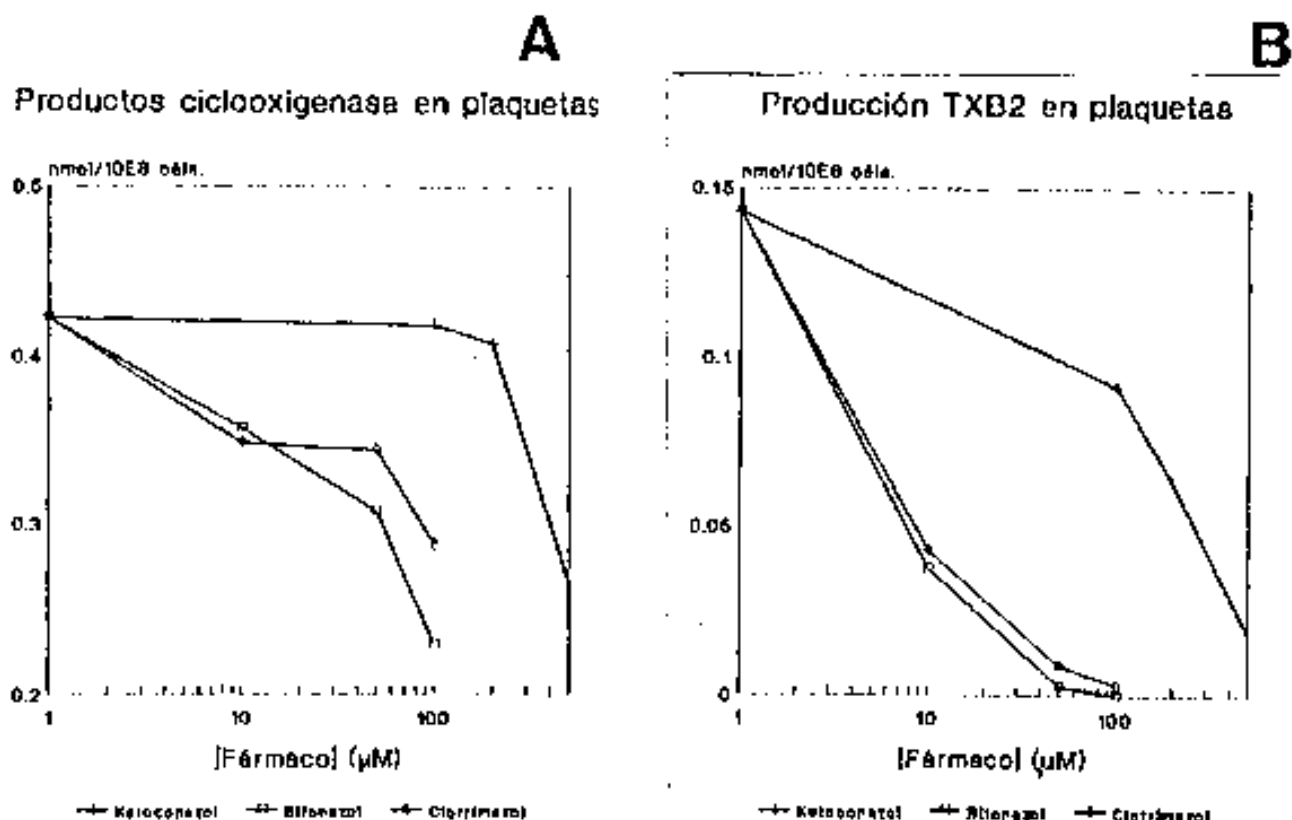


Fig. 5.2.2.3. Producción plaquetar de TXB₂ (a) y de la suma de todos los productos de la ciclooxigenasa (b) en función de la concentración de cada fármaco.

En la figura 5.2.2.3 se muestra la producción de TXB₂ (a), así como la cantidad total de ¹⁴C-AA transformado a través de la vía de la ciclooxigenasa (b), en función de la concentración de cada fármaco.

Se observó un débil efecto inhibitorio de la actividad de la ciclooxigenasa en todos los fármacos estudiados, mientras que el efecto inhibitorio sobre la síntesis de TXB₂ por parte de las plaquetas humanas fue más importante.

Producción 12-HETE en plaquetas

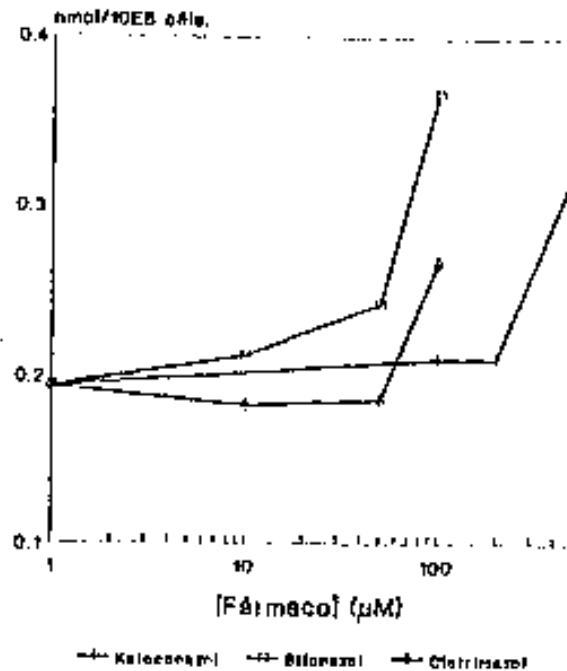


Fig. 5.2.2.4. Producción plaquetar de 12-HETE en función de la concentración de cada fármaco.

En la figura 5.2.2.4 se representa la producción de 12-HETE en función de la concentración de cada fármaco, pudiendo observarse un ligero aumento en la producción de 12-HETE concomitante a la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa, y secundario probablemente a la desviación del sustrato a través de la vía de la 12-lipoxigenasa, como indica la figura 5.2.2.5.

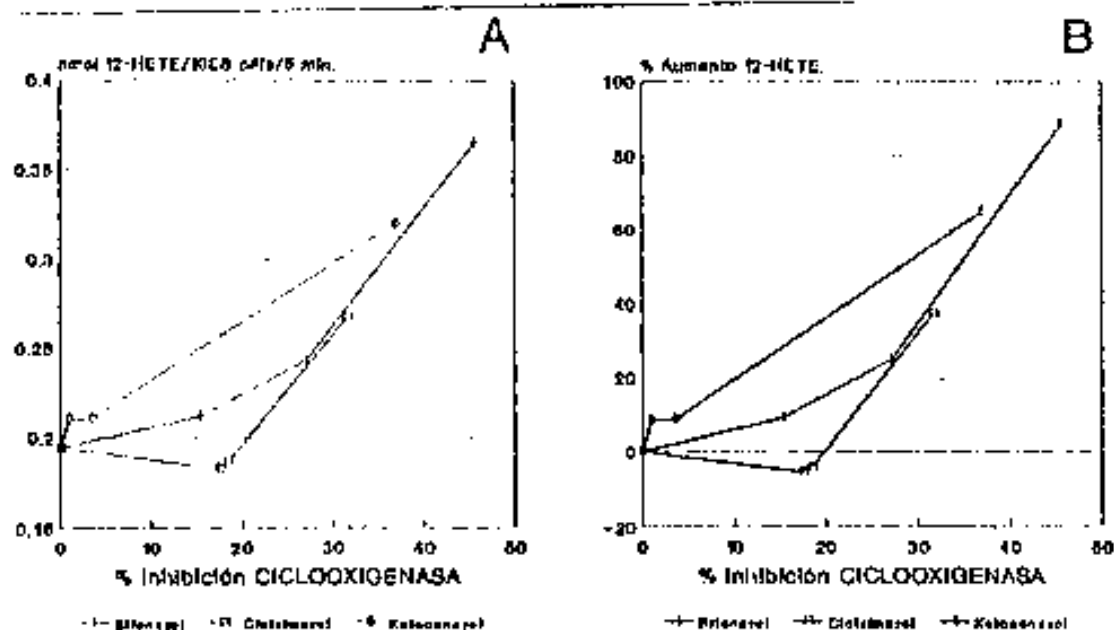


Fig. 5.2.2.5. Producción absoluta plaquetar de 12-HETE (a) o incremento relativo de la misma respecto al control (b) en función del porcentaje de inhibición de la ciclooxigenasa por cada fármaco.

En la figura 5.2.2.5 se representa la cantidad de ¹⁴C-AA (en nmol) transformada por la vía de la 12-lipoxigenasa (A) o el porcentaje de incremento de la misma con respecto a los valores basales (B) en función del porcentaje promedio de inhibición de la síntesis de todos los productos de la ciclooxigenasa, para cada fármaco y concentración ensayados. El aumento en la producción de 12-HETE tiende a correlacionarse con el porcentaje de inhibición de la

ciclooxigenasa en el rango de concentraciones estudiado, si bien de forma no exactamente lineal.

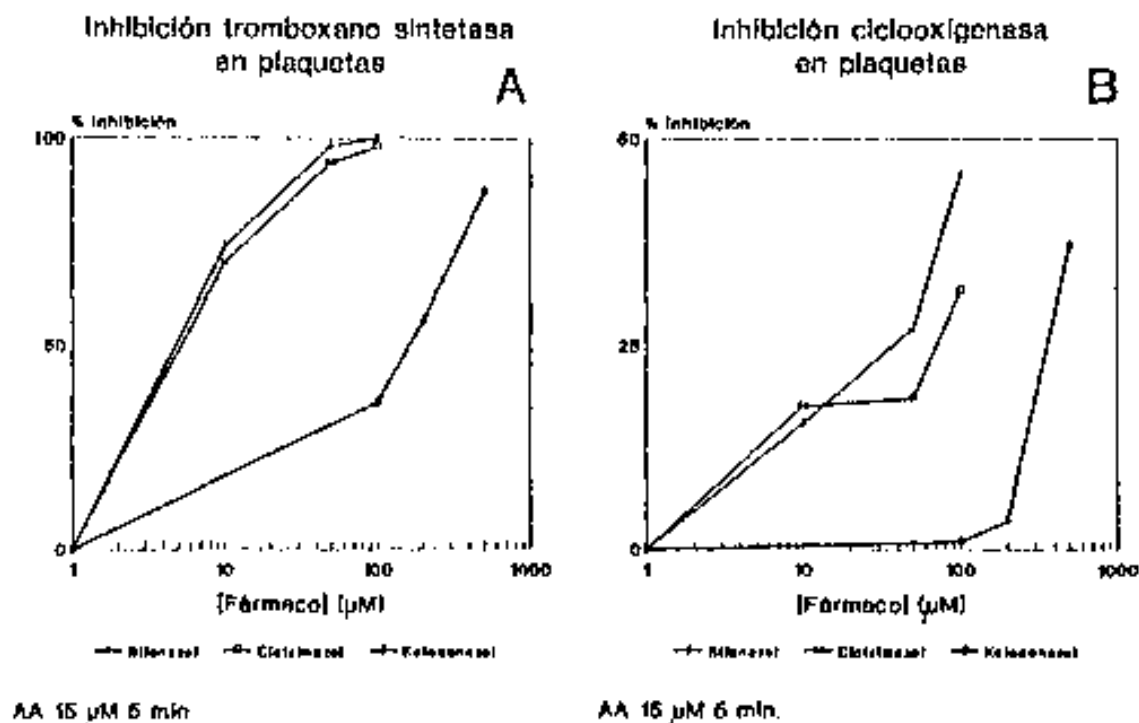


Fig. 5.2.2.6. Porcentaje de inhibición de la tromboxano sintetasa (a) o la ciclooxigenasa (b) plaquetar en función de la concentración de cada fármaco.

En la figura 5.2.2.6 se representa el porcentaje de inhibición de la actividad de la tromboxano sintetasa (A) y de la ciclooxigenasa, evaluada como suma de las actividades de los picos correspondientes (B), en función de la concentración de cada uno de los fármacos.

A partir de estos datos pudieron calcularse o estimarse las IC_{50} de cada uno de los imidazoles con respecto a la actividad de la tromboxano sintetasa y la ciclooxigenasa, respectivamente:

Fármaco	$IC_{50} \pm SD$ (μM)	$IC_{50} \pm SD$ (μM)
	Tromboxano sintetasa	Ciclooxigenasa
Bifonazol	7.1 ± 1.2	100 (estimación)
Clotrimazol	7.5 ± 1.3	150 (estimación)
Ketoconazol	132.0 ± 19.7	750 (estimación)

En base a estos datos, se observa que a igualdad de concentraciones, el ketoconazol es el inhibidor más débil de los tres imidazoles ensayados con respecto a la actividad de la tromboxano sintetasa, siendo el clotrimazol y el bifonazol unas 20 veces más potentes. Los tres imidazoles ensayados presentan una escasa actividad inhibitoria de la ciclooxigenasa plaquetar, si bien el correspondiente orden de potencia es análogo.

5.3. CICLOSPORINA A

5.3.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN SUSPENSIONES DE CELULAS EPIDERNICAS HUMANAS.

El perfil metabólico típico de las suspensiones de queratinocitos (Figura 5.3.1.1, abajo) incubadas en presencia de ^{14}C -AA $10\ \mu\text{M}$ y A23187 $5\ \mu\text{M}$ durante 10 minutos a 37°C , presentaba 4 picos principales que coeluyeron con 12-HETE, PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y HHT.

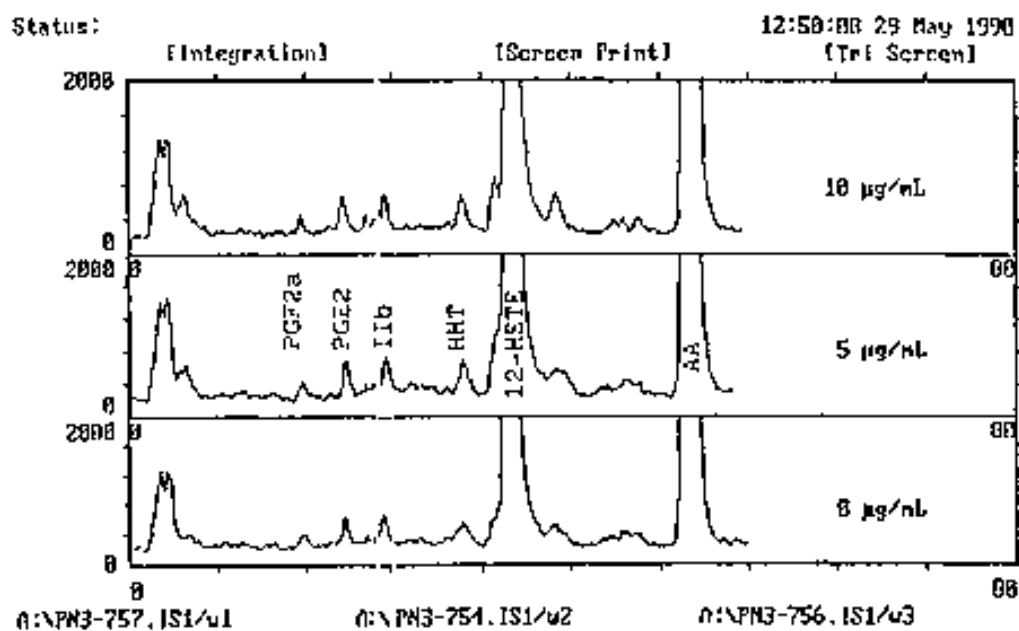


Fig. 5.3.1.1. Radiocromatogramas correspondientes al metabolismo del AA exógeno en suspensiones de células epidérmicas, previa incubación durante 10 minutos con ciclosporina a las concentraciones de 0, 5 y $10\ \mu\text{g/mL}$.

En la figura 5.3.1.1 se muestran asimismo los cromatogramas obtenidos preincubando las suspensiones de células epidérmicas durante 10 minutos con 5 $\mu\text{g/ml}$ (centro) y 10 $\mu\text{g/ml}$ (arriba) de ciclosporina.

La preincubación con ciclosporina no produce alteraciones apreciables en cuanto al metabolismo del AA exógeno en suspensiones de células epidérmicas con respecto al control.

Síntesis eicosanoides x céls. epidérmicas

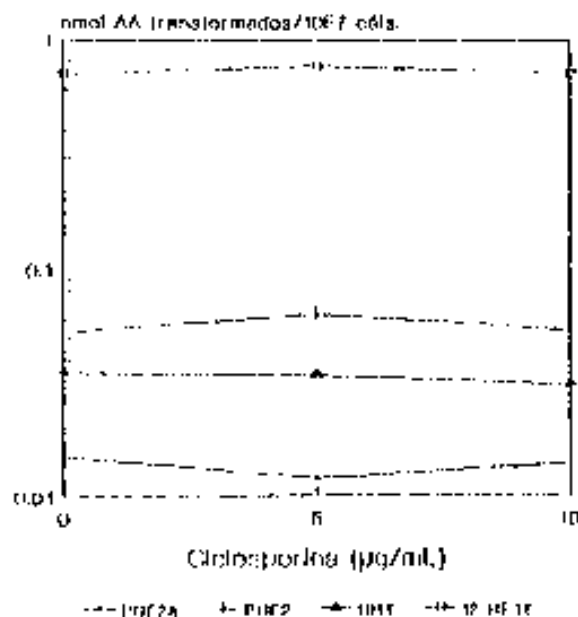


Fig. 5.3.1.2.

En la figura 5.3.1.2 se puede apreciar la falta de efecto de la ciclosporina, a las concentraciones empleadas, sobre la producción de 12-HETE, PGE₂, PGE_{2a} y 11HT, cuantificada en nanomoles de AA transformados en cada uno de los productos por 10⁷ células.

En la figura 5.3.1.3 se representa la producción de 12-HETE y 15-HETE, los dos metabolitos principales del AA por la vía de las

12- y 15-lipoxigenasa en células epidérmicas

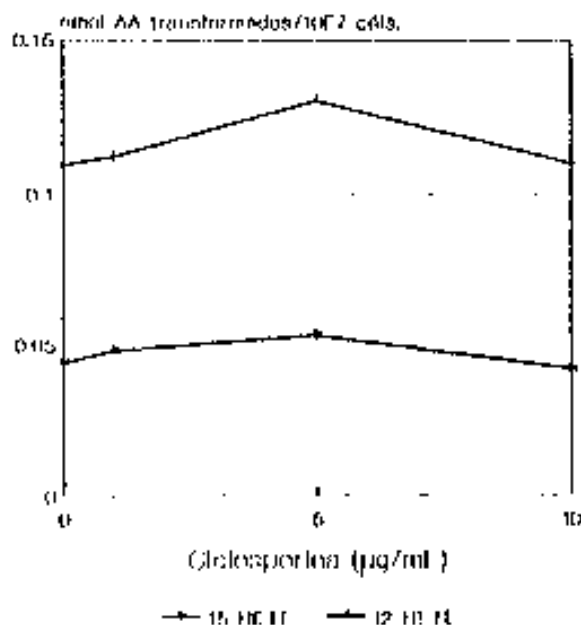


Fig. 5.3.1.3.

lipoxigenasas en los queratinocitos humanos, expresada en nanomoles de AA transformados en cada uno de los productos por 10^7 células, tras la incubación de suspensiones de células epidérmicas en ausencia o presencia de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina. Como se puede apreciar, a las concentraciones empleadas tampoco se observaron diferencias con respecto al control.

5.3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CICLOSPORINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS DERMICOS HUMANOS.

Los resultados del estudio preliminar comparativo del metabolismo del AA entre cultivos de fibroblastos procedentes de piel lesional psoriásica y de piel normal se muestran en la figura 5.3.2.1.

Producción eicosanoides x fibroblastos Controles-Psoriásicos

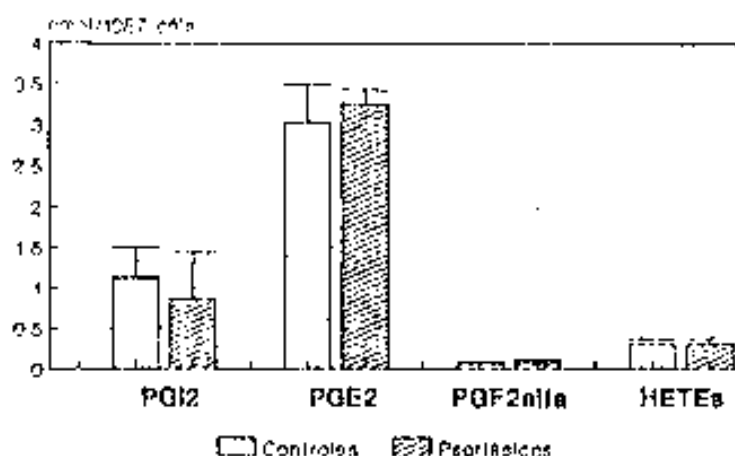


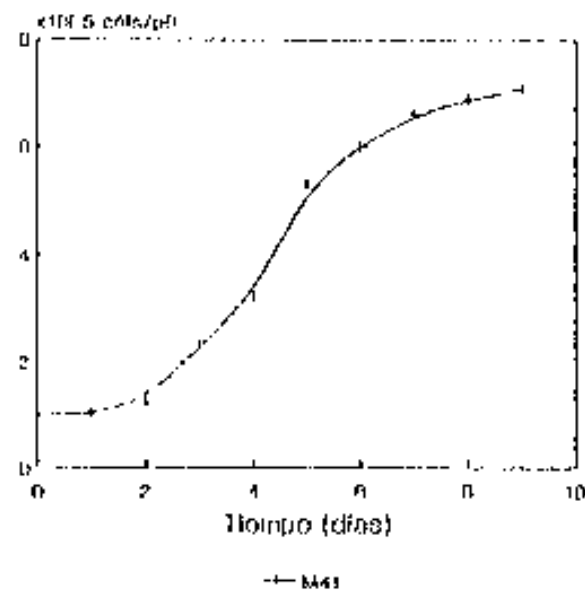
Fig. 5.3.2.1. Estudio comparativo del metabolismo del AA exógeno en fibroblastos de pacientes psoriásicos y control.

No se observaron diferencias en el metabolismo del AA por la vía de la ciclooxigenasa ni de las lipoxigenasas, por lo que se consideró adecuado el empleo de muestras de piel normal procedentes de intervenciones de cirugía plástica, por su mayor disponibilidad, para realizar los ulteriores estudios del posible efecto farmacológico de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos.

En la figura 5.3.2.2 se representa una curva de crecimiento normal de los fibroblastos en cultivo en fase 6 o 7, en los que se igualan las diferencias en cuanto a las curvas de crecimiento existentes entre las muestras. Los estudios se efectuaron siempre en células procedentes de cultivos en pocillo en fase de confluencia temprana (6×10^5 células/pocillo), que habitualmente se alcanzó entre el 59 y el 79 día de cultivo en las condiciones empleadas.

Se efectuó un estudio de viabilidad celular, para determinar el rango de concentraciones de ciclosporina a emplear en los estudios del metabolismo del AA, puesto que en situaciones de lesión o

Curva de crecimiento Fibroblastos dérmicos humanos normales



Poco 7

Fig. 5.3.2.2. Curva de crecimiento fibroblastos dérmicos normales en cultivo.

muerte celular pueden variar las características cualitativas o cuantitativas de la síntesis de eicosanoides por parte de los fibroblastos dérmicos, y aun cuando ello no fuera así, un menor número de células determinaría una mayor disponibilidad de sustrato exógeno por célula, lo que modificaría los resultados obtenidos con independencia del efecto de la ciclosporina.

Los resultados del estudio se ilustran en la figura 5.3.2.3, que demuestra el efecto citotóxico de la ciclosporina sobre los fibroblastos dérmicos humanos en cultivo, a concentraciones superiores a $5 \mu\text{g/ml}$.

El efecto citotóxico de la ciclosporina sobre cultivos de fibroblastos dérmicos humanos en fase de confluencia temprana es

Mortalidad celular en fibroblastos

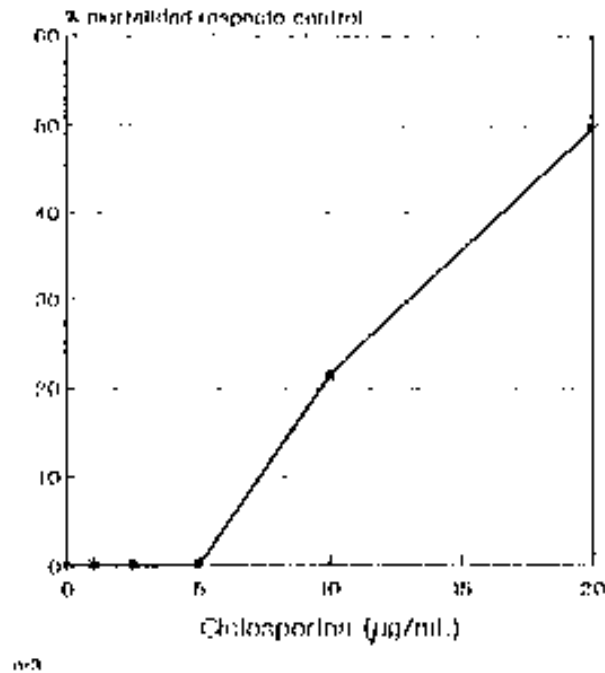
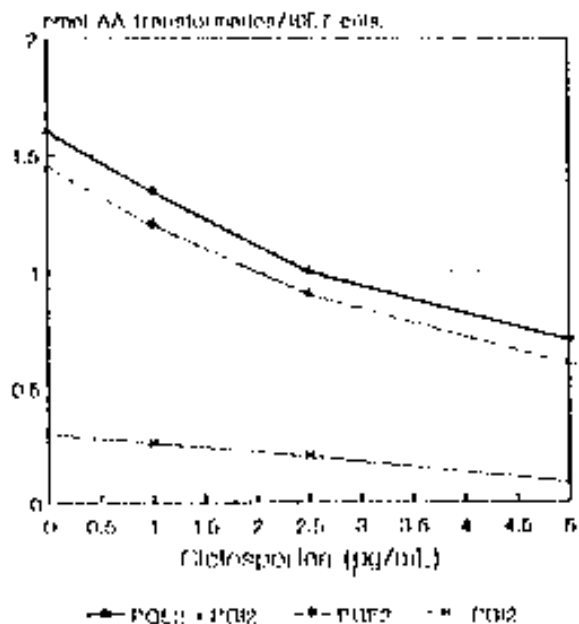


Fig. 5.3.2.3. Estudio de viabilidad en fibroblastos tratados con ciclosporina.

correlaciona con la concentración de forma aproximadamente lineal: el porcentaje de mortalidad celular con respecto al control tras la exposición durante 24 horas a ciclosporina 10 µg/ml y 20 µg/ml fue de 21.42 ± 2 y 49.65 ± 2.5 % (media \pm s.d.) respectivamente. Por consiguiente, se eligieron las concentraciones de 0, 1, 2.5 y 5 µg/ml de ciclosporina para evaluar el efecto de la incubación a largo plazo (24 horas) sobre el metabolismo del AA por fibroblastos dérmicos humanos en cultivo.

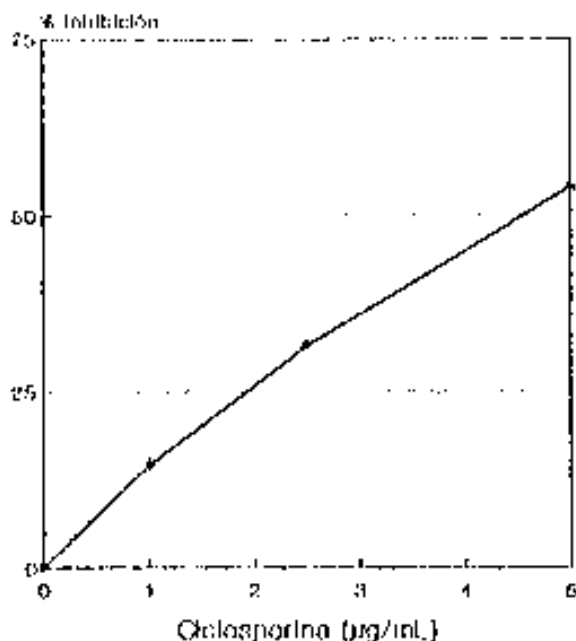
En la figura 5.3.2.4a se ilustra el efecto inhibitor de la incubación con ciclosporina sobre la producción, expresada en nanomoles de ^{14}C -AA transformados por 10^7 células en 15 minutos, de los principales productos del metabolismo del AA en los fibroblastos dérmicos humanos en cultivo, la PGE_2 y la PGI_2 , cuya suma representa

Productos ciclooxigenasa en fibroblastos



AA 25 µM, 30 min.

Inhibición ciclooxigenasa en fibroblastos



AA 25 µM, 30 min.

Fig. 5.3.2.4. Efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA exógeno por la vía de la ciclooxigenasa en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos. A: producción total; B: porcentaje de inhibición respecto al control.

la actividad global de la ciclooxigenasa en dicho tipo celular.

El efecto inhibitorio de la ciclosporina sobre la actividad de la ciclooxigenasa se correlaciona linealmente con la concentración de ciclosporina en el rango ensayado, como puede apreciarse en la figura 5.3.2.4b, de donde puede inferirse la IC₅₀ de la ciclosporina con respecto a la inhibición de la ciclooxigenasa en este modelo experimental, que sería de 4.47 ± 0.4 µg/mL.

5.4. PROTOCOLO ACIDO EICOSAPENTANOICO

Completaron el período de tratamiento, con un adecuado cumplimiento de la prescripción y sin aparición de efectos adversos, todos los pacientes que se incluyeron en el estudio. Los datos demográficos de los pacientes al inicio del estudio, el trimestre de entrada en el estudio, así como el PASI inicial y al inicio del tratamiento, se resumen a continuación.

	Aceite de pescado	Aceite de oliva
Edad (años; rango)	43.7 (23-59)	42.4 (16-59)
Sexo (M/F)	7/2	8/1
Tiempo evol. psoriasis (años; rango)	16.7 (1-40)	18.2 (5-36)
Trimestre de entrada en protocolo		
1º (n)	4	4
2º (n)	3	1
3º (n)	1	1
4º (n)	1	3
Peso inicial (kg; media \pm sd)	80.2 \pm 14.2	71.1 \pm 9.9
PASI semana -3 (media \pm sd)	22.8 \pm 12.9	23.1 \pm 8.1
PASI semana 0 (media \pm sd)	23.2 \pm 13.7	23.4 \pm 11.4

El análisis estadístico de los datos no demostró diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento.

Las medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes al peso en kg para cada grupo de tratamiento y determinación se detallan en la siguiente Tabla. No se apreciaron diferencias significativas en cuanto al peso en ninguno de ambos grupos de tratamiento a lo largo de todo el protocolo, lo que indica que ambas poblaciones eran similares en cuanto al peso y en la dieta

ni el tratamiento influyeron de forma global apreciable sobre el balance energético de los pacientes.

	Aceite de pescado	Aceite de oliva
Peso inicial (kg; m \pm sd)	80.2 \pm 14.2	71.1 \pm 9.9
Peso semana 0 (kg; m \pm sd)	79.1 \pm 13.1	70.1 \pm 10.4
Peso semana 8 (kg; m \pm sd)	79.7 \pm 12.9	70.8 \pm 9.3

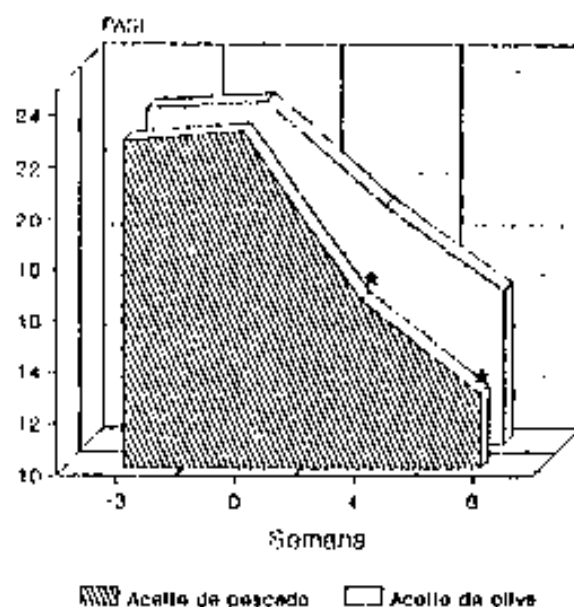
Parámetros clínicos. La evolución clínica de los pacientes, expresada en forma de PASI, se detalla a continuación y se ilustra en la Fig. 5.4.1.

	Aceite de pescado	Aceite de oliva
PASI semana -3 (m \pm sd)	22.8 \pm 10.0	23.1 \pm 8.1
PASI semana 0 (m \pm sd)	23.2 \pm 13.7	23.4 \pm 11.4
PASI semana 4 (m \pm sd)	16.5 \pm 17.1	19.4 \pm 9.5
PASI semana 8 (m \pm sd)	12.9 \pm 18.8	16.0 \pm 13.1

En la Fig. 5.4.1 puede apreciarse la disminución en los valores promedio de PASI para ambos grupos de tratamiento, que es estadísticamente significativa sólo en el caso del grupo tratado con aceite de pescado con respecto a la semana 0 ($p < 0.05$, T de Wilcoxon).

Si bien puede apreciarse que los valores promedio del PASI en las semanas 4 y 8 son inferiores en el grupo tratado con aceite de pescado que en el grupo de pacientes a los que se administró aceite de oliva, las diferencias observadas no alcanzaron significación estadística.

Efectos sobre el PASI
Aceite de pescado-aceite de oliva

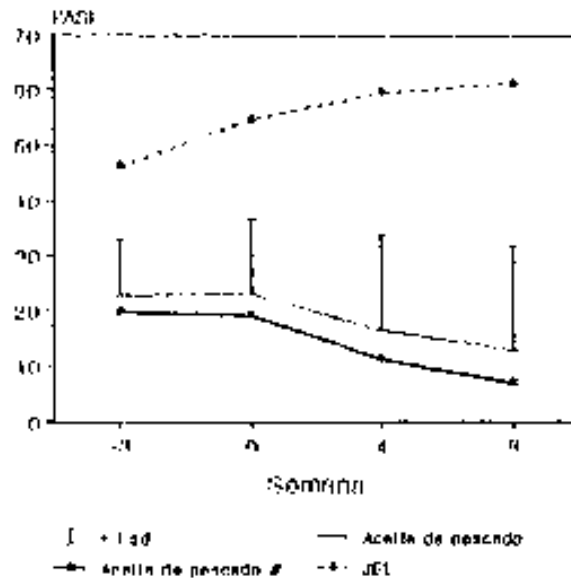


* * $p < 0.05$ respecto SO
no diferencias entre grupos Ito

Fig. 5.4.1. Evolución clínica (PASI).

Analizando con mayor detalle los datos individuales para cada paciente y grupo de tratamiento, pudo observarse que uno de los pacientes incluidos en el grupo de tratamiento con aceite de pescado (JEL), si bien en el momento de su entrada en el protocolo presentaba un PASI ligeramente inferior a 50, en la semana 0 de inicio del tratamiento y en sucesivos controles presentó un empeoramiento de su psoriasis en extensión e intensidad, apartándose del comportamiento de los demás componentes del estudio y de su grupo de tratamiento, como ilustra la Fig. 5.4.2. Puesto que la evolución ulterior de este paciente permite considerarlo como un caso de psoriasis grave y rebelde a diferentes tratamientos tópicos y sistémicos, habiendo requerido dos hospitalizaciones, se decidió excluirlo del estudio a efectos del análisis estadístico una vez abierto el protocolo. Si bien todos los resultados y análisis

Efectos sobre el PASI Aceite de pescado



depurando caso con valores extremos
n = 9

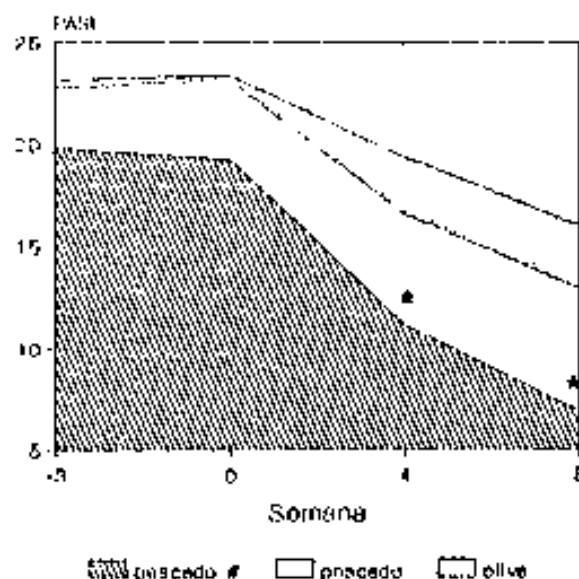
Fig. 5.4.2. Valores PASI promedio en el grupo tratado con aceite de pescado, incluyendo o no al caso atípico (JEL).

estadísticos que se presentarán de ahora en adelante hacen referencia al grupo tratado con aceite de pescado habiendo depurado este caso de comportamiento atípico, la inclusión del mismo no modifica la homogeneidad de ambos grupos con respecto a los parámetros iniciales ni altera los resultados que se enunciarán, si bien hace que disminuya en algunos casos la significación estadística de las diferencias observadas.

Los valores del PASI correspondientes a ambos grupos de tratamiento, una vez depurado el caso con valores atípicos en el grupo tratado con aceite de pescado, se detallan a continuación y se ilustran en la Fig. 5.4.3.

	Aceite de pescado# n=8	Aceite de oliva n=9
PASI semana -3 (m ± sd)	19.8 ± 5.1	23.1 ± 8.1
PASI semana 0 (m ± sd)	19.2 ± 7.3	23.4 ± 11.4
PASI semana 4 (m ± sd)	11.2 ± 6.1	19.4 ± 9.5
PASI semana 8 (m ± sd)	6.9 ± 5.3	16.0 ± 13.1

Efectos sobre el PASI
Aceite de pescado-aceite de oliva



#: duplicando caso
*: p<0.05 respecto S-3 y S0
dis. no signif. entre grupos Tto.

Fig. 5.4.3. Evolución clínica (PASI) en los grupos de tratamiento a lo largo del estudio.

En la Fig. 5.4.3. puede apreciarse la disminución en los valores promedio de PASI para ambos grupos de tratamiento, que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) sólo en el caso del grupo tratado con aceite de pescado en las semanas 4 y 8 con respecto a las semanas -3 y 0, y en la semana 8 con respecto a la semana 4 ($p < 0.05$, T de Wilcoxon). Si bien los valores promedio del PASI en el grupo tratado con aceite de pescado son inferiores a los

correspondientes al grupo tratado con aceite de oliva, las diferencias no alcanzan significación estadística en ningún caso.

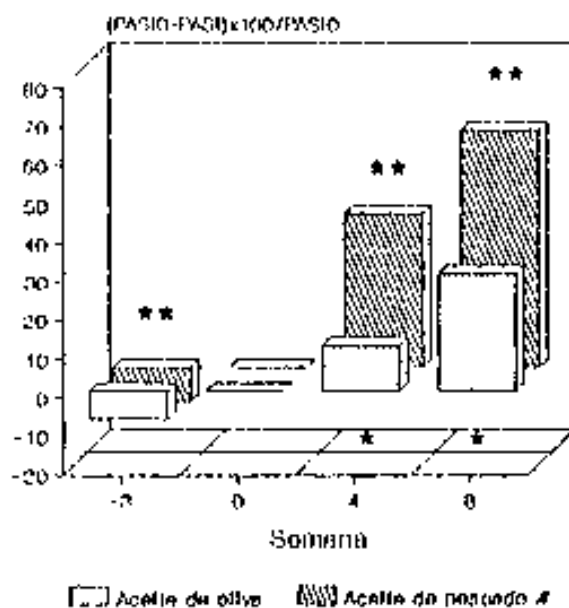
Por lo que respecta al porcentaje de mejoría relativa del PASI (% Rel) con respecto a la semana 0 (inicio del período de tratamiento), los valores correspondientes a ambos grupos de tratamiento, una vez depurado el caso con valores atípicos en el grupo tratado con aceite de pescado, se detallan a continuación y se ilustran en la Fig. 5.4.4.

	Aceite de pescado# n=8	Aceite de oliva n=9
% Rel semana -3 (m ± sd)	-8.7 ± 25.4	-7.2 ± 24.9
% Rel semana 4 (m ± sd)	40.1 ± 32.1	11.8 ± 26.0
% Rel semana 8 (m ± sd)	61.6 ± 33.9	30.6 ± 37.8

Si bien las diferencias entre grupos de tratamiento no alcanzaron significación estadística, en las semanas 4 y 8 las diferencias fueron casi significativas ($p < 0.1$, prueba U de Mann-Whitney). En cambio, las diferencias en cuanto al porcentaje promedio de mejoría relativa entre las diferentes semanas de protocolo fueron altamente significativas en todos los casos en el grupo tratado con aceite de pescado y en el conjunto de pacientes, mientras que sólo fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$, T de Wilcoxon) las diferencias entre la semana 8 y la semana -3 en el grupo tratado con aceite de oliva. Ello indica que el grado de mejoría aumentó con el transcurso del tiempo, especialmente en el grupo tratado con aceite de pescado (Fig. 5.4.4).

Las puntuaciones correspondientes a la valoración global del grado de eritema, infiltración y descamación, que podían oscilar entre 0 y 16 y permitieron el cálculo del valor del PASI en cada visita, se analizaron por separado para comparar su capacidad de discriminación clínica con respecto al PASI. Si bien estas variables son

**Evolución porcentaje mejora respecto
Aceite de pescado-aceite de oliva**



*: p<0.1 entre grupos. No
**: p<0.05 entre semanas (grupo pescado)

Fig. 5.4.4. Porcentaje de mejora relativa en el PASI con respecto a los valores de la semana 0.

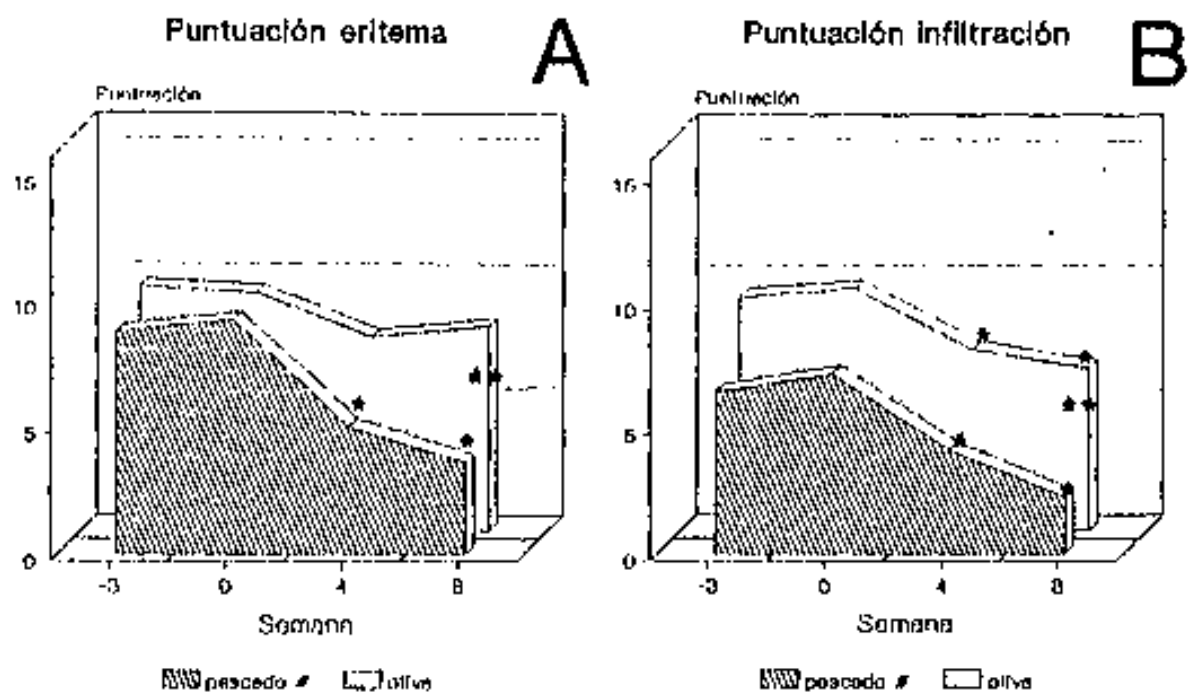
discontinuas (no paramétricas), los valores se expresan en forma de media y desviación estándar, para facilitar su interpretación y teniendo en cuenta que la distribución de los datos cumple la hipótesis de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) en cada grupo de tratamiento en todos los casos.

Los valores correspondientes a ambos grupos de tratamiento, una vez depurado el caso con valores atípicos en el grupo tratado con aceite de pescado, se detallan a continuación y se ilustran en las Figs. 5.4.5a (eritema), 5.4.5b (infiltración) y 5.4.5c (descamación).

	Aceite de pescado# n=8	Aceite de oliva n=9
Eritema -3 (m ± sd)	8.7 ± 2.6	9.7 ± 2.1
Eritema 0 (m ± sd)	9.2 ± 4.0	9.4 ± 3.5
Eritema 4 (m ± sd)	5.0 ± 2.1	7.7 ± 3.0
Eritema 8 (m ± sd)	3.6 ± 2.5	8.1 ± 3.3
Infiltración -3 (m ± sd)	6.4 ± 2.8	9.3 ± 3.4
Infiltración 0 (m ± sd)	7.1 ± 3.3	9.7 ± 4.3
Infiltración 4 (m ± sd)	4.1 ± 2.3	7.2 ± 3.4
Infiltración 8 (m ± sd)	2.3 ± 2.1	6.4 ± 3.5
Descamación -3 (m ± sd)	7.9 ± 1.9	10.7 ± 2.8
Descamación 0 (m ± sd)	8.1 ± 2.2	10.4 ± 3.8
Descamación 4 (m ± sd)	5.3 ± 2.8	8.7 ± 2.8
Descamación 8 (m ± sd)	3.4 ± 3.0	7.3 ± 2.6

El análisis estadístico de los datos demuestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de tratamiento ($p < 0.05$, U de Mann-Whitney) en cuanto al grado de eritema (menor en el grupo tratado con aceite de pescado) en la semana 8 de tratamiento, y confirma la mejoría que se observa en las semanas 4 y 8 con respecto a las semanas -3 y 0 (inicio del protocolo y del tratamiento respectivamente) y en la semana 8 con respecto a la semana 4 en el grupo tratado con aceite de pescado ($p < 0.05$, T de Wilcoxon), como se ilustra en la Fig. 5.4.5a.

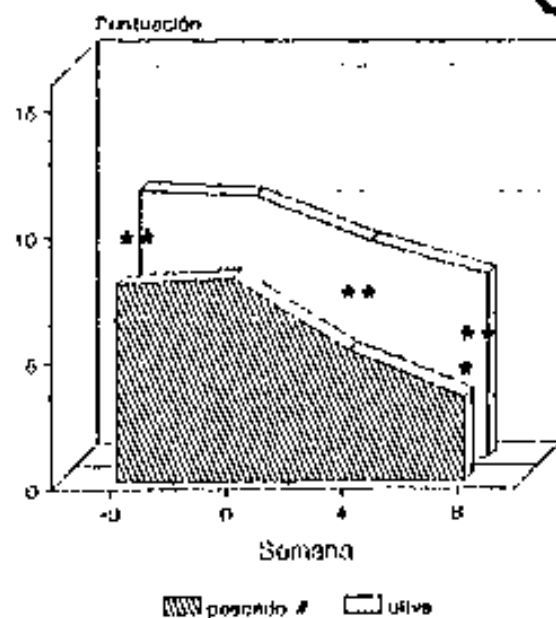
Por lo que respecta al grado de infiltración clínica o induración de las placas de psoriasis (Fig. 5.4.5b), se observan resultados similares, siendo menor a la 8ª semana de tratamiento en el grupo al que se administró aceite de pescado, y extendiéndose la significación estadística de la mejoría observada con el transcurso del protocolo (semanas 4 y 8 entre sí y con respecto al inicio de la



* = $p < 0.05$ respecto S0
 ** = $p < 0.05$ entre grupos Tto.

* = $p < 0.05$ respecto S0
 ** = $p < 0.05$ entre grupos Tto.

Puntuación descamación **C**



* = $p < 0.05$ respecto S0
 ** = $p < 0.05$ entre grupos Tto.

Fig. 5.4.5. Evolución clínica de los parámetros eritema, infiltración y descamación en el transcurso del estudio. Promedio para cada grupo y semana de evaluación.

administración de cápsulas de aceite) a ambos grupos de tratamiento.

Finalmente, por lo que respecta al grado de descamación (Fig. 5.4.5c), se observan resultados similares, si bien el grado de descamación es menor en el grupo al que se administró aceite de pescado tanto al inicio como en las semanas 4 y 8 del protocolo, y la significación estadística de la mejoría observada con el transcurso del protocolo (semana 8 con respecto a la semana -3) se extiende a ambos grupos de tratamiento, mientras que sólo en el grupo tratado con aceite de pescado se observa una mejoría estadísticamente significativa con respecto al inicio del tratamiento (semana 0).

En la Fig. 5.4.6 se ilustran dos ejemplos del aspecto clínico y la evolución típicos de las lesiones en dos pacientes tratados con aceite de pescado.

La respuesta de los pacientes en el transcurso del protocolo se correlaciona bien con el porcentaje de mejoría en el índice PASI, de acuerdo con el cual pueden subdividirse los pacientes de acuerdo con su respuesta clínica en 5 grupos, según se produzca empeoramiento, mejoría leve (0-25%), moderada (>25-50%), buena (>50-75%), o excelente (>75-100%).



A



B

Fig. 5.4.6. Aspecto clínico de las lesiones en dos pacientes pertenecientes al grupo tratado con aceite de pescado, en la semana 0 (a) y 8 (b) del estudio, ilustrando una respuesta típica.



A



B

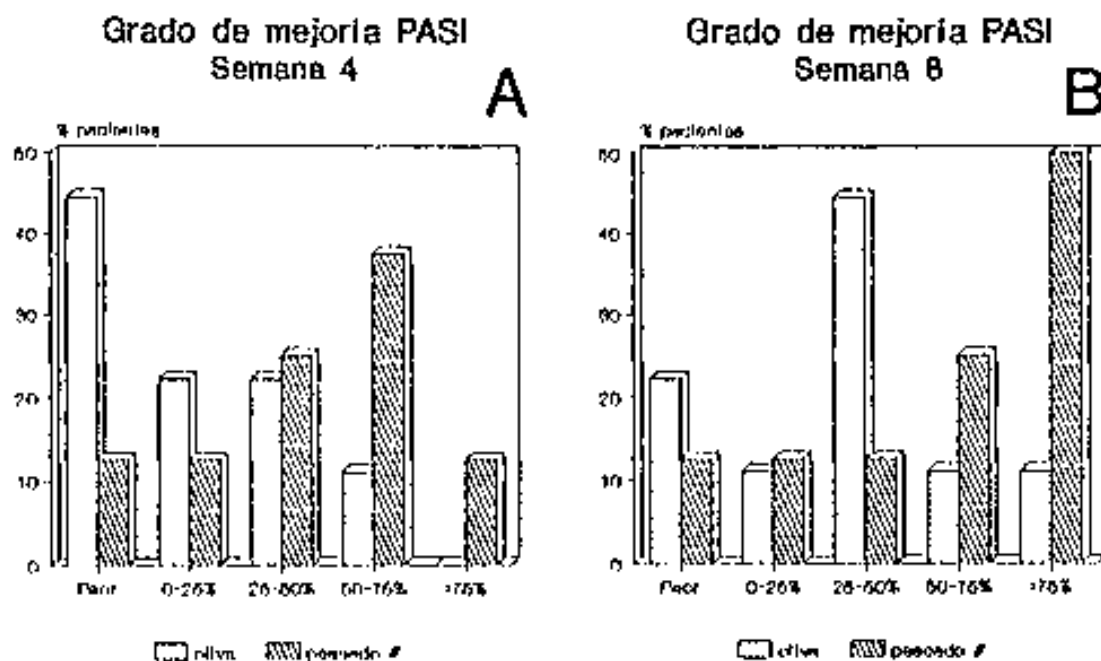


Fig. Distribución de los pacientes según el grado de mejoría y por grupos de tratamiento, a la semana 4 (A) y 8 (B) de tratamiento.

En la Fig. 5.4.7 se representa la distribución de los pacientes por grupos de tratamiento y grado de mejoría en las semanas 4 (a) y 8 (b), lo que permite la comparación visual pero no el análisis estadístico (χ^2) debido al escaso número de casos. Como puede apreciarse, los pacientes tratados con aceite de pescado tienden a presentar mejor respuesta clínica que los tratados con aceite de oliva, tanto en la 4ª como en la 8ª semanas de tratamiento.

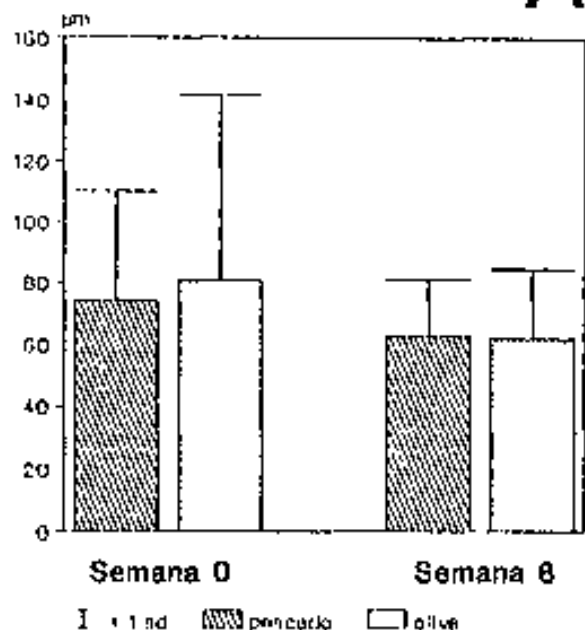
Evaluación histológica. Los valores obtenidos en la valoración histológica de los tres parámetros que se determinaron, como promedio de tres observaciones, en secciones transversales de biopsias de placas de psoriasis al inicio y final del período de tratamiento para cada paciente, a saber, espesor de la capa córnea, grosor de la placa suprapapilar y acantosis (midiendo la distancia

entre la porción más inferior de las crestas interpapilares y la capa granulosa), expresados en μm , se detallan en la siguiente Tabla.

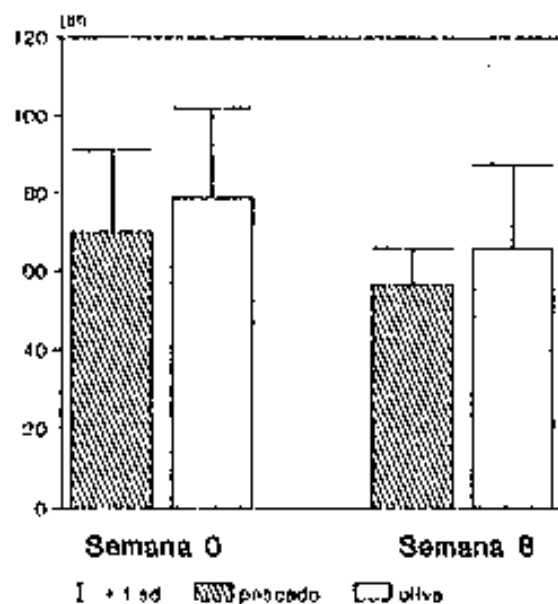
	Aceite de pescado#	Aceite de oliva
	n=8	n=9
Córnea 0 (μm ; $m \pm sd$)	74.4 \pm 35.4	80.8 \pm 60.5
Córnea 8 (μm ; $m \pm sd$)	62.9 \pm 18.5	62.2 \pm 22.5
Placa supr. 0 (μm ; $m \pm sd$)	69.9 \pm 21.2	78.9 \pm 23.1
Placa supr. 8 (μm ; $m \pm sd$)	55.5 \pm 9.3	65.9 \pm 21.5
Crestas 0 (μm ; $m \pm sd$)	316.1 \pm 90.6	385.3 \pm 91.8
Crestas 8 (μm ; $m \pm sd$)	235.8 \pm 80.1	348.0 \pm 104.7

Si bien tiende a observarse una reducción global en todos los parámetros histológicos entre el inicio y final del período de tratamiento, más acusada en el grupo tratado con aceite de pescado (Figs. 5.4.8a-c), el análisis estadístico de los resultados de la evaluación histológica sólo demuestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de tratamiento ($p < 0.05$, U de Mann-Whitney) en cuanto al grado de acantosis (menor en el grupo tratado con aceite de pescado) en la semana 8 de tratamiento, mientras que sólo en el caso del grupo tratado con aceite de pescado se observa una mejoría en dicho parámetro en la semana 8 con respecto a la semana 0, que casi alcanza la significación estadística ($p < 0.1$, T de Wilcoxon), como se ilustra en la Fig. 5.4.8e.

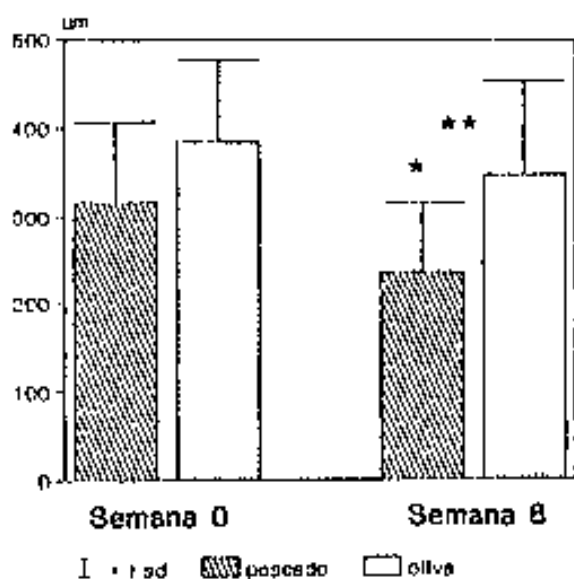
Histopatología Capa córnea **A**



Histopatología Placa suprapapilar **B**



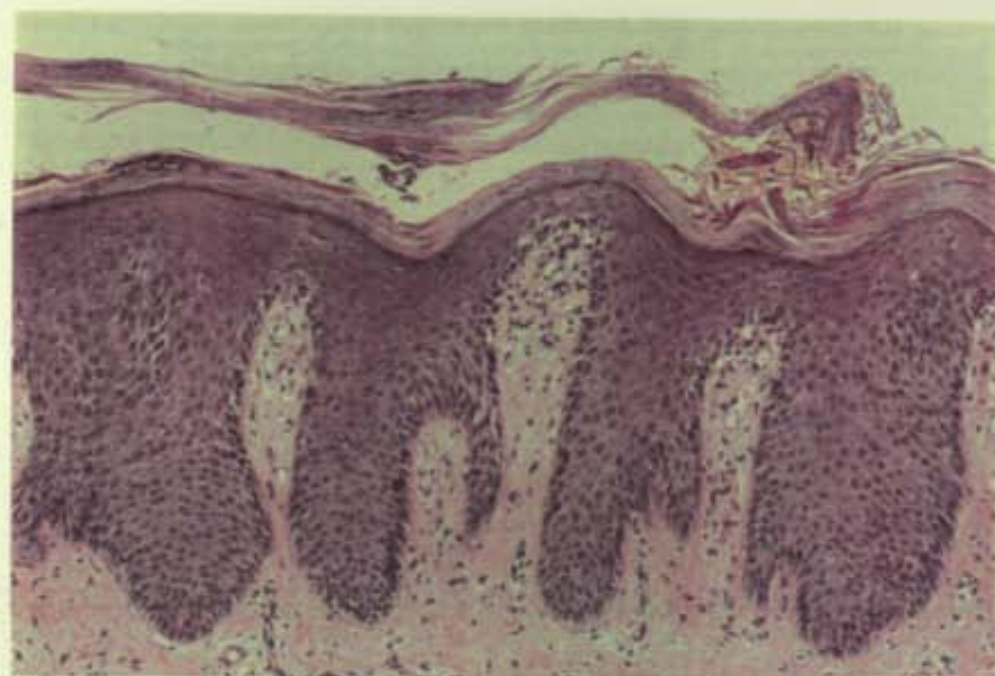
Histopatología Acanthisis epidérmica **C**



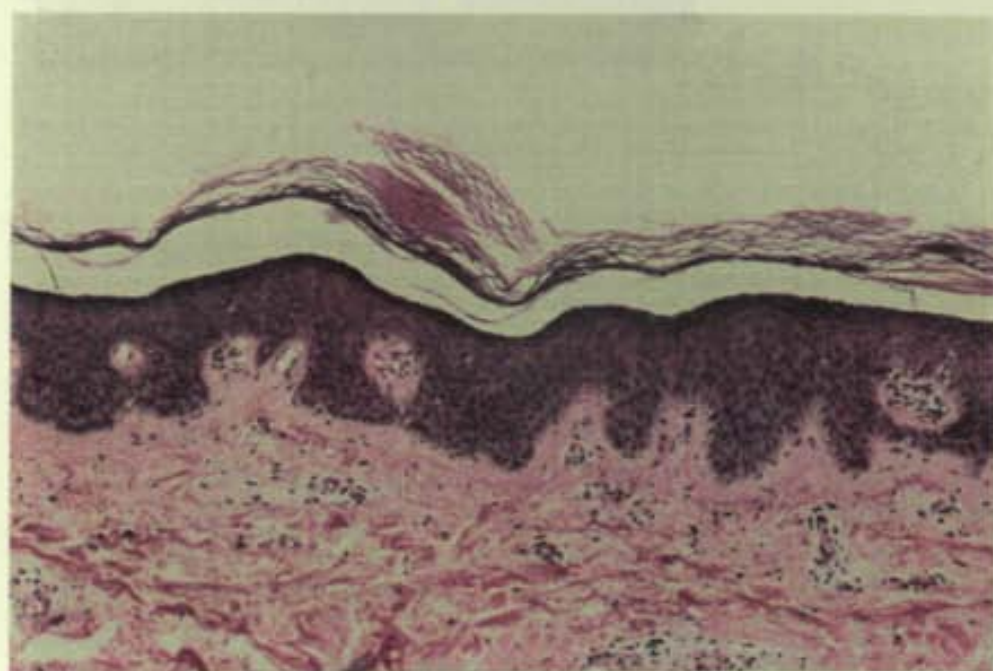
*: $p < 0.1$ respecto S0

** : $p < 0.05$ entre grupos T10.

Fig. 5.4.8. Parámetros histopatológicos. A: espesor de la capa córnea; B: distancia entre la capa granulosa y la punta de las papilas dérmicas; C: distancia entre la capa granulosa y el extremo de las crestas interpapilares.



A



B

Fig. 5.4.9. Microfotografías correspondientes a biopsias de lesiones de psoriasis, al principio (a, c) y al final (b, d) del periodo de tratamiento. H&E, 400x.



← COR

← SUPRAP

← ACAN

C



D

En la Fig. 5.4.9 se ilustra el aspecto histológico de dos biopsias representativas correspondientes al inicio (a, c) y final (b, d) del período de tratamiento con aceite de pescado (a, b) o de oliva (c, d), y la forma en que se determinaron los parámetros histológicos (COR = capa córnea; SUPRAP = placa suprapapilar; ACAN= distancia capa granulosa - punta de la cresta interpapilar).

Determinaciones analíticas. No se detectaron alteraciones ni diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ni en relación con el transcurso del tiempo (semana 0 respecto a semana 8) en cuanto a los parámetros analíticos determinados en muestras de sangre obtenidas en el transcurso del protocolo. A continuación se resumen los resultados (media \pm s.d.) correspondientes a los parámetros determinados en el estudio de lípidos, expresados en mmol/l.

	Aceite de pescado# n=8	Aceite de oliva n=9
Semana 0		
Triglicéridos	1.93 \pm .38	.96 \pm .24
Colesterol total	5.54 \pm .82	5.14 \pm 1.02
Colesterol HDL	1.31 \pm .51	1.23 \pm .43
Colesterol LDL	4.01 \pm .62	3.50 \pm .77
Colesterol VLDL	.35 \pm .19	.33 \pm .11
Apo AI	1.38 \pm .36	1.13 \pm .15
Apo B	1.14 \pm .16	1.14 \pm .28
Apo E:		
Colesterol VLDL	.31 \pm .19	.41 \pm .14
Colesterol IDL	.22 \pm .09	.12 \pm .02
Colesterol LDL	3.49 \pm .58	3.13 \pm .90
Colesterol HDL	1.61 \pm .54	1.23 \pm .26
Triglicéridos VLDL	.47 \pm .31	.55 \pm .22
Triglicéridos IDL	.06 \pm .02	.05 \pm .01

Triglicéridos LDL	.28 ± .05	.26 ± .08
Triglicéridos HDL	.21 ± .05	.18 ± .03
Fosfolípidos VLDL	.19 ± .13	.26 ± .09
Fosfolípidos IDL	.14 ± .05	.08 ± .01
Fosfolípidos LDL	1.13 ± .18	1.08 ± .32
Fosfolípidos HDL	1.09 ± .40	.87 ± .18
Semana 8		
Triglicéridos	1.01 ± .26	1.00 ± .25
Colesterol total	5.83 ± .94	5.64 ± 1.27
Colesterol HDL	1.31 ± .52	1.46 ± .36
Colesterol LDL	4.19 ± .56	4.32 ± 1.12
Colesterol VLDL	.36 ± .14	.37 ± .13
Apo A1	1.39 ± .48	1.24 ± .14
Apo B	1.22 ± .18	1.10 ± .35
Apo E:		
Colesterol VLDL	.36 ± .14	.35 ± .17
Colesterol IDL	.22 ± .08	.19 ± .11
Colesterol LDL	3.49 ± .52	3.39 ± .60
Colesterol HDL	1.63 ± .62	1.61 ± .55
Triglicéridos VLDL	.48 ± .18	.49 ± .17
Triglicéridos IDL	.05 ± .02	.04 ± .02
Triglicéridos LDL	.30 ± .06	.30 ± .06
Triglicéridos HDL	.21 ± .05	.22 ± .05
Fosfolípidos VLDL	.22 ± .07	.23 ± .07
Fosfolípidos IDL	.14 ± .05	.12 ± .07
Fosfolípidos LDL	1.17 ± .18	1.13 ± .21
Fosfolípidos HDL	1.19 ± .45	1.19 ± .40

Evaluación del efecto del tratamiento sobre el metabolismo del AA endógeno en suspensiones de PMN. En todos los pacientes se estudió el efecto del tratamiento sobre el perfil metabólico del AA endógeno en suspensiones de PMN, comparando los cromatogramas y cuantificando los picos de absorción ultravioleta correspondientes a la semana 0 (inicio) y la semana 8 (final) del período de tratamiento, previa codificación para impedir la identificación del paciente, grupo o semana de tratamiento correspondientes a las muestras. El número de muestras disponibles en la semana -3 fue insuficiente para permitir la valoración estadística de los resultados. Se efectuaron incubaciones por quintuplicado de suspensiones de PMN durante 30 segundos o 5 minutos a 37°C, en presencia de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 5 µM), con el objeto de activar la 5-lipoxigenasa.

En la Fig. 5.4.10 se ilustra la superposición de dos cromatogramas típicos, correspondientes a incubaciones de 5 minutos de muestras procedentes de un mismo paciente del grupo tratado con aceite de pescado, al inicio (semana 0) y final (semana 8) del período de tratamiento.

incluyendo el LTB₄, si bien no pudieron identificarse con seguridad por la no disponibilidad de patrones auténticos. Sin embargo, la aparición de dichos picos se produjo de forma constante y exclusiva en la semana 8 de tratamiento y sólo en el grupo de pacientes a los que se administró aceite de pescado, y permitió en todos los casos confirmar la ingesta del mismo, e incluso identificarla en base tan sólo al aspecto del cromatograma. De hecho, en uno de los pacientes, a quien se practicó la extracción correspondiente a la semana 0 cuando ya había iniciado la ingesta de aceite de pescado, la detección de picos correspondientes a los mencionados metabolitos determinó la exclusión de la muestra a efectos del análisis estadístico de los resultados.

Para cada muestra se determinaron los valores promedio de las 5 determinaciones para cada uno de los siguientes parámetros, correspondientes a las incubaciones de 30 segundos y 5 minutos: 6-trans-LTB₄ (t-LTB₄), 6-trans-12-epi-LTB₄ (e-LTB₄), LTB₄, 5-HETE, productos de la ω -oxidación del LTB₄ (ω -ox. LTB₄), suma de LTB₄ y productos de la ω -oxidación del LTB₄ (suma LTB₄) y suma de todos los productos de la actividad de la 5-lipoxigenasa (suma 5-lipo). Los resultados (media \pm s.d.) correspondientes a cada grupo de tratamiento y semana de la determinación, y expresados en picomoles de AA transformados en producto(s) por 10⁶ células, se reflejan en la siguiente Tabla.

	Aceite de pescado#	Aceite de oliva
Semana 0		
30 segundos de incubación		
t-LTB ₄	15.09 \pm 28.37	8.15 \pm 24.45
e-LTB ₄	8.21 \pm 14.18	2.80 \pm 8.39
LTB ₄	100.48 \pm 129.71	46.82 \pm 65.14
5-HETE	93.06 \pm 107.63	59.83 \pm 61.34
ω -ox. LTB ₄	20.94 \pm 44.36	8.33 \pm 12.58
suma LTB ₄	121.45 \pm 172.34	55.13 \pm 75.16
suma 5-lipo	237.81 \pm 312.05	122.59 \pm 166.69

5 minutos de incubación

t-LTB ₄	126.98 ± 22.3	109.61 ± 53.89
e-LTB ₄	106.49 ± 31.05	92.12 ± 49.28
LTB ₄	616.91 ± 170.54	526.67 ± 251.88
5-HETE	702.18 ± 245.46	718.73 ± 399.29
ω-ox. LTB ₄	457.64 ± 124.05	344.83 ± 171.72
suma LTB ₄	1083.35 ± 258.48	867.37 ± 370.00
suma 5-lipo	2018.99 ± 449.03	1776.84 ± 750.81

Semana 8

30 segundos de incubación

t-LTB ₄	3.89 ± 6.69	3.85 ± 8.36
e-LTB ₄	2.40 ± 6.36	14.91 ± 35.14
LTB ₄	83.46 ± 130.16	48.32 ± 74.00
5-HETE	99.07 ± 134.79	60.68 ± 94.94
ω-ox. LTB ₄	56.69 ± 67.28	32.30 ± 46.62
suma LTB ₄	140.18 ± 178.86	80.92 ± 94.16
suma 5-lipo	245.54 ± 307.52	160.37 ± 199.94

5 minutos de incubación

t-LTB ₄	118.09 ± 88.59	149.04 ± 79.18
e-LTB ₄	99.87 ± 66.53	136.37 ± 75.27
LTB ₄	544.82 ± 220.33	453.68 ± 220.36
5-HETE	609.16 ± 388.77	597.06 ± 311.65
ω-ox. LTB ₄	381.79 ± 283.69	395.58 ± 195.19
suma LTB ₄	926.61 ± 499.26	847.01 ± 385.37
suma 5-lipo	1628.60 ± 1107.68	1731.72 ± 806.02

El análisis estadístico de los resultados indica que no existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de metabolitos del AA por la vía de la 5-lipoxigenasa en suspensiones de PMN, para ninguno de los tiempos de incubación empleadas, entre grupos de tratamiento ni en relación con la semana

de tratamiento en que se obtuvieron las muestras de sangre. Los niveles basales de los diferentes metabolitos producidos a los 30 segundos de incubación presentan una gran dispersión, lo que los hace poco adecuados para estudios comparativos, si bien tienden a ser algo inferiores en el grupo que siguió tratamiento con aceite de oliva, aunque las diferencias observadas no alcanzan significación estadística.

Evaluación del efecto del tratamiento sobre el metabolismo del AA endógeno en suspensiones de plaquetas. En todos los pacientes se estudió el efecto del tratamiento sobre el perfil metabólico del AA endógeno en suspensiones de plaquetas, comparando los cromatogramas y cuantificando los picos de absorción ultravioleta correspondientes a la semana 0 (inicio) y la semana 8 (final) del período de tratamiento, previa codificación para impedir la identificación del paciente, grupo o semana de tratamiento correspondientes a las muestras. El número de muestras disponibles en la semana -3 fue insuficiente para la valoración estadística de los resultados. Se efectuaron incubaciones por quintuplicado de suspensiones de plaquetas durante 10 segundos o 5 minutos a 37°C, en presencia de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 5 μ M), con el objeto de activar el metabolismo del AA endógeno.

Para cada muestra se calcularon los valores correspondientes al HHT y 12-HETE producidos por las plaquetas tras incubaciones de 30 segundos y 5 minutos en presencia de A23187 5 μ M, como promedio de las 5 determinaciones.

Los resultados (media \pm s.d.) correspondientes a cada grupo de tratamiento y semana de la determinación, y expresados en pmol de AA transformados en producto por 10^6 células, se reflejan en la siguiente Tabla.

	Aceite de pescado#	Aceite de oliva
Semana 0		
10 segundos de incubación		
HHT	326.95 ± 353.40	254.70 ± 222.17
12-HETE	180.61 ± 206.26	198.31 ± 310.25
5 minutos de incubación		
HHT	886.19 ± 591.52	798.66 ± 396.40
12-HETE	2051.47 ± 913.67	1416.04 ± 838.42
Semana 8		
10 segundos de incubación		
HHT	262.68 ± 264.60	794.62 ± 538.80
12-HETE	155.73 ± 158.79	222.63 ± 92.65
5 minutos de incubación		
HHT	429.69 ± 438.80	1893.33 ± 1165.12
12-HETE	1010.19 ± 899.79	2310.41 ± 1607.59

Por lo que respecta a la comparación entre grupos de tratamiento, la producción de HHT y 12-HETE, tanto a los 10 segundos como a los 5 minutos de incubación, por las plaquetas de los pacientes, fue similar en ambos grupos de tratamiento a la semana 0, mientras que en las muestras obtenidas a las 8 semanas de tratamiento fue menor en el grupo tratado con aceite de pescado que en el grupo de pacientes a quienes se administró aceite de oliva. El análisis estadístico de los resultados demuestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la producción de HHT, tanto a los 10 segundos como a los 5 minutos de incubación, y prácticamente significativas ($p < 0.1$) en cuanto a la producción de 12-HETE a los 5 minutos de incubación.

Por lo que respecta a la evaluación del posible efecto del tratamiento sobre la síntesis de metabolitos del AA endógeno por las plaquetas de los pacientes, al final (semana 8) del período de tratamiento, se observó, tanto para el HHT como para el 12-HETE, y con independencia del tiempo de incubación empleado, una tendencia a la disminución en el grupo tratado con aceite de pescado y una tendencia al aumento en el grupo tratado con aceite de oliva, con respecto a los niveles correspondientes al inicio del período de tratamiento (semana 0). El análisis estadístico de los resultados demostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la síntesis de 12-HETE a los 5 minutos de incubación en un 50% con respecto a los valores iniciales en el grupo tratado con aceite de pescado, mientras que la producción de HHT y 12-HETE a los 5 minutos de incubación en el grupo tratado con aceite de oliva aumentó de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$) hasta un 100% y un 50% con respecto a los valores basales, respectivamente, y el aumento en los niveles de HHT a los 10 segundos de incubación fue prácticamente significativo ($p < 0.1$).

En la Fig. 5.4.11 se representan los valores correspondientes a la media y desviación estándar de la producción de HHT (5.4.11a) y 12-HETE (5.4.11b) por las plaquetas de los pacientes a los 5 minutos de incubación, para visualizar mejor las diferencias observadas.

Las magnitud y significación estadística de las diferencias observadas en todos los casos se mantienen al incluir los valores correspondientes al caso de comportamiento atípico (JEL) en el grupo tratado con aceite de pescado.

Finalmente, se efectuó un análisis del grado de correlación estadística entre los parámetros utilizados para evaluar la respuesta clínica, histológica y bioquímica. Tan sólo se observó una correlación significativa en el conjunto de los pacientes a la semana 8 entre el valor del índice FASI, el porcentaje de mejoría

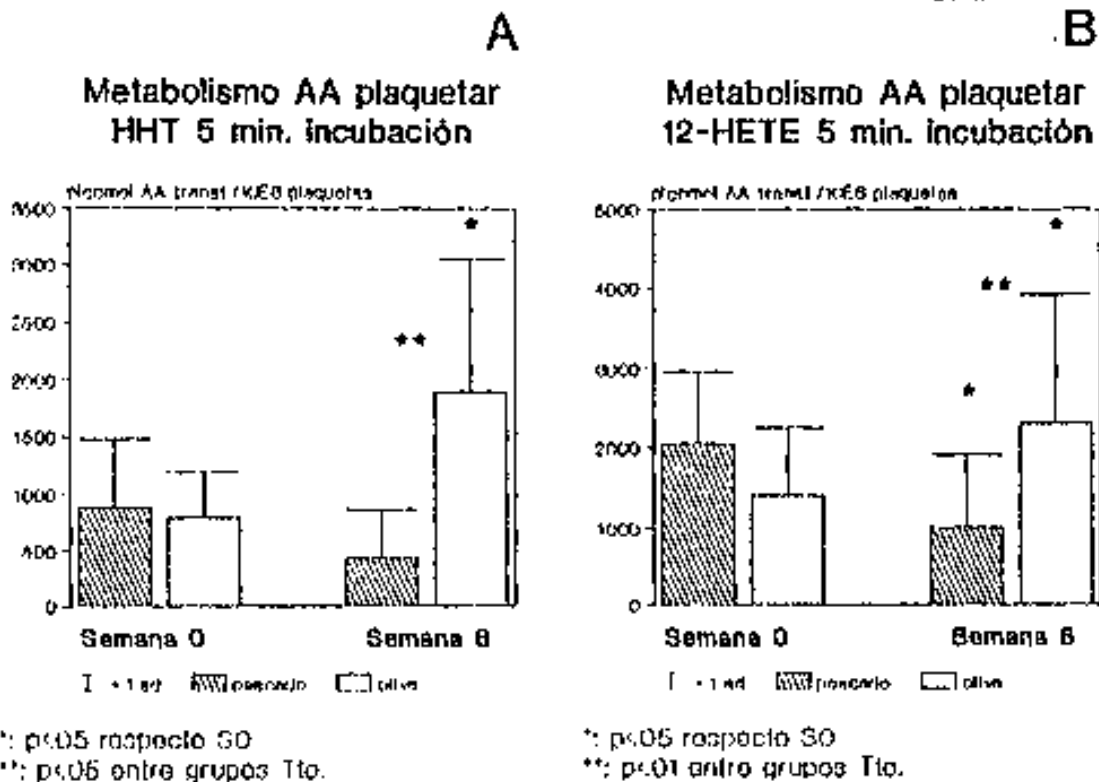


Fig. 5.4.11. Efecto del tratamiento sobre la producción máxima plaquetar de HHT (a) y 12-HETE (b) a partir del AA endógeno.

relativa, el grado de acantosis y los valores de producción plaquetar de 12-HETE a los 5 minutos de incubación. La correlación de los valores del PASI con el grado de acantosis fue excelente ($r=0.9$), y algo menos evidente con el porcentaje de mejoría relativa o los valores de 12-HETE.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la existencia de una tendencia global a la mejoría en pacientes con psoriasis crónica en placas, estable y de intensidad moderada, sometidos a tratamiento dietético durante 8 semanas, y demuestran un efecto positivo del tratamiento con aceite de pescado con respecto al aceite de oliva. Alcanzan significación estadística la mejoría en el PASI, tanto por lo que respecta al grado de



critera como de infiltración o desquamación y el porcentaje relativo de mejoría con el transcurso del tratamiento en el grupo tratado con aceite de pescado, así como el grado de acantosis histológica a la 8ª semana de tratamiento en el mismo grupo. La tolerancia del tratamiento fue excelente, con un perfecto cumplimiento de la prescripción (pese al tamaño y número de las cápsulas que debían ingerir) por parte de todos los pacientes y ausencia de efectos adversos, tanto desde el punto de vista clínico como analítico, destacando especialmente la ausencia de modificaciones en el estudio lipídico efectuado. Por lo que respecta al efecto del tratamiento sobre el metabolismo del AA en PMN o suspensiones de plaquetas, no se observó diferencia entre los grupos de tratamiento o efecto alguno del mismo sobre los primeros, siendo preferibles para su análisis comparativo los resultados correspondientes a incubaciones de 5 minutos, por la menor dispersión de los mismos. Por el contrario, sí se apreció una disminución significativa en cuanto a la producción de HHT y 12-HETE, a los 5 minutos de incubación, por las plaquetas de los pacientes correspondientes al grupo tratado con aceite de pescado y un aumento significativo de la producción de HHT y 12-HETE por las suspensiones de plaquetas, incubadas durante 5 minutos, correspondientes al grupo de pacientes tratados con aceite de oliva, con respecto al inicio del período de tratamiento.

6 . DISCUSSION .

5.1 ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA 5-LIPOXIGENASA (PIRIPROST, LONAPALENE) SOBRE OTRAS VÍAS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO ACTIVAS EN SUSENSIONES DE CELULAS EPIDERMICAS Y DE PLAQUETAS.

Como consecuencia de los estudios efectuados con piriprost (6,9-deepoxi-5,9-(fenilimino)- 6,8-prostaglandina 1₁, U-60257) y lonapalene(1,4-diacetoxi-6-cloro-2,3-dimetoxinaftaleno,RS-43179), puede afirmarse que se ha confirmado el efecto inhibitor de ambos fármacos sobre la 5-lipoxigenasa en PMN humanos, siendo las correspondientes IC50 de 50 μ M y 20 μ M respectivamente.

Por lo que respecta a su efecto sobre el metabolismo del AA en suspensiones de plaquetas humanas, el piriprost ha demostrado ser un débil inhibidor de la tromboxano sintetasa y no tiene efecto alguno sobre la 12-lipoxigenasa a las concentraciones estudiadas. A la concentración de 10 μ M no se observó un efecto significativo sobre la síntesis de TXB₂ o HHT, siendo estos resultados coherentes con los obtenidos por otros autores [455,456] que no encuentran inhibición de la formación de los productos de la actividad de la ciclooxigenasa en plaquetas con esta concentración de fármaco.

El piriprost es un inhibidor competitivo potente de la 5-lipoxigenasa [455,457,458] y la glutatión-transferasa que da lugar a la síntesis de péptidoleucotrienos [457], mientras que es un débil inhibidor de la ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa, y no tiene efecto sobre la síntesis de 12-HETE a las concentraciones estudiadas, como muestran nuestros resultados. A la concentración de 10 μ M no se observó un efecto significativo sobre la síntesis de TXB₂ o HHT, lo que concuerda con los resultados de estudios previos [455,456]. Otros autores [457] obtuvieron un aumento de la producción de TXB₂ en leucocitos mononucleares de rata utilizando concentraciones superiores a 10 μ M de piriprost. Este aumento fue probablemente debido al desplazamiento del metabolismo del AA por

inhibición de la 5-lipoxigenasa hacia la vía de la ciclooxigenasa. Otros investigadores [458] han observado asimismo un efecto inhibitorio sobre la tromboxano sintetasa en plaquetas humanas estimuladas con epinefrina, si bien la relevancia de este efecto con respecto a la epidermis leisional psoriásica probablemente sea nula, puesto que esta vía metabólica no está activa en los queratinocitos, tal como se discute en la sección 1.7.1.

Mucho más importante desde el punto de vista de la posible eficacia terapéutica del piritrost es su efecto inhibitorio sobre la 5-lipoxigenasa en los PMN, puesto que este tipo celular constituye un componente importante de las lesiones psoriásicas, sobre todo en las lesiones más inflamatorias, así como en la psoriasis pustulosa o en la psoriasis guttata, y probablemente sea activado *in situ*, dando lugar a la síntesis de LTB_4 , que se encuentra en concentraciones elevadas en las lesiones de psoriasis (cf. apartado 1.6) y es capaz de contribuir al reclutamiento de células inmunes e inflamatorias, amplificando el proceso, y determinar la proliferación epidérmica, como se discute en el apartado 1.8 de la Introducción.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la actividad inhibitoria de cualquier fármaco sobre la 5-lipoxigenasa de los PMN *in vitro* debe confirmarse *in vivo*, puesto que se han descrito discordancias entre ambas situaciones [459], que podrían ser atribuibles a la unión del fármaco a proteínas como la albúmina, inhibiendo su actividad.

El efecto inhibitorio del piritrost sobre las funciones de los PMN *in vitro* no se limita a la síntesis de LTB_4 , sino que también se extiende a la liberación de enzimas lisosómicos [460], la quimiotaxis de neutrófilos [458] y la liberación de superóxido en respuesta a la estimulación con A23187 [460] o *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina [460,461]. Es de especial trascendencia el efecto

inhibidor del piriprost sobre la activación de los neutrófilos humanos por interleucina-1 [462], cuyo papel como citocina cutánea de actividad proinflamatoria, en la modulación del sistema inmune cutáneo y en la patofisiología de la psoriasis es objeto de creciente interés [124].

La trascendencia terapéutica de la inhibición de la síntesis de leucotrienos mediante piriprost se ha comprobado en diversas situaciones patofisiológicas, tales como la hiperreactividad bronquial [463-465], la circulación pulmonar fetal [466] o la proliferación in vitro de diversas líneas celulares hematopoyéticas [467].

Sin embargo, no se ha observado efecto alguno, con respecto a la reacción inflamatoria o el acúmulo de PMN, del tratamiento tópico con piriprost en un modelo inflamatorio (fotodermatitis por ultravioletas en piel de rata) caracterizado por un notable aumento (65 veces el valor basal a las 48 horas de la irradiación) en los niveles de LTB_4 [468]. El tratamiento tópico con piriprost o AA-861, otro inhibidor de la 5-lipoxigenasa, produjo una intensa inhibición del mencionado aumento, lo que indica el carácter secundario del acúmulo de LTB_4 con respecto a la patofisiología de la respuesta inflamatoria en este modelo experimental. Si bien este resultado es poco alentador por lo que respecta a la posible eficacia del piriprost en el tratamiento tópico de la psoriasis, la diferente fisiopatología de la psoriasis y la variabilidad interespecífica en el patrón de respuesta en cuanto a tipos celulares inflamatorios y producción de mediadores indican el posible interés del desarrollo de una formulación tópica de piriprost y su ensayo clínico en la psoriasis.

Por lo que respecta al lonapalene, recientemente se han publicado los resultados de un estudio integrado clínico-farmacológico a

doble ciego y controlado con placebo, en el que se confirma la eficacia clínica del lonapalene tópico al 2% en el tratamiento de la psoriasis [409]. El análisis farmacológico demostró una reducción significativa en los niveles de LTB_4 en el fluido recogido en cámaras tras abrasión de la epidermis lesional, sin que se observaran variaciones significativas en los niveles de 12-HETE o AA con respecto a las lesiones tratadas con placebo. Esta reducción se produjo en fases iniciales del tratamiento (días 4 y 14) antes de que se apreciara una mejoría clínica significativa, lo que indica que el efecto terapéutico del lonapalene puede estar relacionado con la inhibición de la síntesis de LTB_4 . Estos resultados confirman la posible utilidad clínica de los inhibidores de la 5-lipoxigenasa en el tratamiento tópico de la psoriasis, si bien el efecto irritante del lonapalene por vía tópica puede constituir un inconveniente con vistas a su aplicación clínica.

Una posible explicación del efecto irritante del lonapalene podría ser que actuara sobre las vías metabólicas de diversos mediadores de la inflamación cutánea, tales como los eicosanoides, lo que determinó la realización del presente estudio, destinado a evaluar el efecto del lonapalene sobre el metabolismo del AA en plaquetas. Se eligió este material por su disponibilidad, en contraposición a las dificultades que presentó la valoración reproducible del metabolismo del AA en cultivos de células epidérmicas humanas en nuestros estudios preliminares, y por la aparente similitud de las vías metabólicas representadas en ambos tipos celulares.

Contrariamente a lo descrito por otros autores en publicaciones previas [396], en el presente estudio se ha demostrado una inhibición de la ciclooxigenasa plaquetar por parte del lonapalene. Esta inhibición tiene como consecuencia un aumento significativo de la síntesis de 12-HETE, debido a una desviación del metabolismo del AA hacia las vías no inhibidas, en este caso la de la 12-lipoxigenasa. Por lo tanto el efecto del lonapalene sobre el metabolismo

del AA en plaquetas es muy similar al de la indometacina, aunque las concentraciones necesarias para obtener la misma inhibición son 1000 veces superiores en el caso del lonapalene.

Existen publicaciones contradictorias [383-386], sobre el efecto negativo de la aplicación tópica de indometacina en la psoriasis, debido a una posible desviación del metabolismo del AA hacia las vías de las lipoxigenasas como consecuencia de la inhibición de la ciclooxigenasa. La inflamación local que aparece frecuentemente [406-408,469] tras la aplicación tópica de lonapalene podría explicarse mediante un mecanismo similar.

Los principales metabolitos del AA que se encuentran en niveles elevados en las placas psoriásicas son PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ y 12-HETE [141]. El 12-HETE es el producto mayoritario de los queratinocitos en suspensión, habiéndose descrito asimismo la síntesis de PGE_2 , además de cantidades menores de 15-HETE, $PGF_{2\alpha}$ y PGD_2 [276]. La aplicación tópica o la inyección intradérmica de 12-HETE induce una acumulación de PMN en la epidermis y signos de inflamación en ausencia de espongiosis, aunque las lesiones psoriásicas parecen tolerantes a este efecto [319].

Como se ha mencionado anteriormente, no se han detectado aumentos de los niveles de 12-HETE en los exudados tras la aplicación tópica de lonapalene [408,409], aunque estos resultados podrían ser debidos o bien a la técnica de recogida de las muestras mediante cámaras de succión o bien a la existencia de una producción máxima de 12-HETE en las placas psoriásicas. Por este motivo, estos resultados no descartan totalmente la hipótesis de que el lonapalene, además de inhibir la 5-lipoxigenasa, pudiera tener un efecto relevante sobre el metabolismo del AA en las células epidérmicas, de forma similar a lo que ocurre en el caso de las plaquetas.

El posible efecto del lonapalene sobre la vía metabólica de la 12-lipoxigenasa (en las células epidérmicas -queratinocitos-) es

especialmente relevante en relación con la fisiopatología y el tratamiento de la psoriasis. Como ya se ha mencionado, Hammarström et al. [141] en 1975 demostraron la presencia de niveles muy aumentados de 12-HETE en la epidermis psoriásica en comparación con la no afectada. La patología de la psoriasis se caracteriza por lo menos en parte por una infiltración de PMN y una proliferación epidérmica anormal, que pueden venir mediadas por efecto del 12-HETE: se ha demostrado que el 12-HETE es un agente quimiotáctico para los PMN [330] y promueve la proliferación epidérmica cuando se inyecta por vía intradérmica [334].

Recientemente Woolliard [324] demostró que el 12-HETE presente en extractos de escamas psoriásicas correspondía de hecho al enantiómero 12(R) y no al 12(S)-HETE sintetizado por las plaquetas. Es potencialmente importante el hecho de que el enantiómero 12(R) es más activo que el 12(S)-HETE como promotor de la quimiotaxis de PMN [470] y que desplaza competitivamente al LTB₄ de sus receptores en la membrana de los leucocitos [471]. Sin embargo, pese a que el 12(R)-HETE es el enantiómero predominante en la escama psoriásica, los homogenados de epidermis humana sintetizan 12-S-HETE de forma mayoritaria [271,472], al igual que las plaquetas, por lo que este tipo celular parecería un modelo adecuado para valorar el efecto del lonapalene sobre la ciclooxigenasa y 12-lipoxigenasa y efectuar posibles inferencias con respecto a la epidermis.

No obstante, recientemente se ha demostrado que la 12-lipoxigenasa que se encuentra en la piel difiere farmacológicamente de la que se encuentra en las plaquetas [473]. El L-651,896 es un inhibidor dual de la 5-lipoxigenasa y la 12-lipoxigenasa, siendo su efecto sobre la 12-lipoxigenasa epidérmica unas 4 veces más potente que sobre la 12-lipoxigenasa plaquetar [472,474]. Tanto el inhibidor de la 5-lipoxigenasa AA861 como el "metabolito activo" del lonapalene (6-cloro-2,3-dimetoxi-1,4-naftalenodiona) se han demostrado inactivos como inhibidores de la 12-lipoxigenasa

plaquetar [473] mientras que inhiben la 12-lipoxigenasa presente en la epidermis humana [472]; en este último modelo (homogenados de epidermis humana normal) la IC_{50} del metabolito del Ionapalene sería de unos 10 μ M. Ello constituye un argumento en contra del posible papel postulado para el aumento de la síntesis de 12-HETE, observado en nuestros estudios con plaquetas, en la fisiopatología de la irritación causada por el Ionapalene tópico.

Una interesante cuestión aún no resuelta hace referencia al origen del 12(R)-HETE que se encuentra en las escamas psoriásicas. Se ha postulado el posible origen del 12(R)-HETE como producto del metabolismo del AA a través de monooxigenasas dependientes de P-450, tanto en el tejido hepático de la rata [475] como en suspensiones de células epidérmicas normales [276], en las que se ha demostrado la actividad de una monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 que genera 12-HETE, con predominio del estereoisómero 12(S). Sin embargo, existen datos farmacológicos en contra de la actividad de esta vía metabólica en homogenados de epidermis, tanto humana (falta de estímulo por NADPH o inhibición por SKF525A) [472,476] como murina (falta de inhibición por monóxido de carbono) [477].

Otro posible mecanismo de producción del enantiómero 12(R) a partir del 12(S)-HETE podría ser una isomerización directa, enzimática o química, o bien una primera oxidación del 12(S)-HETE, acoplada a una reducción del 12-ceto-eicosatetraenoico resultante, que no se han documentado hasta la fecha.

Finalmente, según postulan Humes y Opas [476], la piel lesional psoriásica podría constituir un microambiente apropiado para la foto- y autooxidación del AA, al existir grandes cantidades del mismo en áreas expuestas a oxígeno molecular, radiación ultravioleta y otros posibles oxidantes ambientales. En esta situación se producirían cantidades equimolares de ambos isómeros del 12-HETE,

y subsiguientemente se esterificaría preferencialmente el isómero 12(S) en los fosfolípidos y triglicéridos celulares, pasando a constituir el 12(R)-HETE el principal producto que se encontraría en la escama psoriásica, que sería el equivalente de un registro fósil de los acontecimientos bioquímicos que habrían tenido lugar previamente en la situación inflamatoria de la epidermis (y la dermis) lesional.

Se requieren estudios adicionales empleando preparaciones de 12-lipoxigenasa o células intactas procedentes de la epidermis y la dermis psoriásica para determinar cuál es el isómero que se sintetiza preferencialmente, así como el origen y papel fisiopatológico (si lo tiene) del 12(R)-HETE que se encuentra en la escama psoriásica.

Creemos interesante profundizar en el estudio del efecto de los fármacos inhibidores de la 5-lipoxigenasa, y en especial de los fármacos que presentan un efecto adicional como inhibidores de la 12-lipoxigenasa epidérmica (lonapalene, L-651,896) y sus posibles derivados, en queratinocitos y otros componentes celulares de las placas psoriásicas, así como desarrollar las técnicas más apropiadas para el estudio de su efecto *in vivo* sobre placas de psoriasis.

Teniendo en cuenta la posible existencia de desconexiones entre la actividad farmacológica *in vivo* e *in vitro*, como se ha comprobado en el caso del L-652,343 [459], son necesarios estudios experimentales exhaustivos a fin de conseguir modelos de estudio farmacológico que permitan el diseño de tratamientos tópicos más eficientes y la mayor comprensión de su(s) mecanismo(s) de acción a través de la correlación clínica-bioquímica.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que, si bien desconocemos el defecto básico que determina la predisposición a la psoriasis en sus diversas formas, cada vez tenemos mayor información sobre los

mecanismos patofisiológicos (inespecíficos) de esta enfermedad. En el desarrollo de las lesiones de psoriasis intervienen secuencialmente una serie de mediadores e interacciones inmunológicas que pueden ser objeto de modulación farmacológica, entre los que destacan por su importancia y ubicuidad celular los eicosanoides. El importante papel de estos mediadores lipídicos en el desarrollo, mantenimiento y eventual resolución espontánea o terapéutica de las lesiones de psoriasis requiere de estudios adicionales, que hemos emprendido, haciendo especial hincapié en el origen celular de los mismos *in situ*, su destino biológico (retención, exportación, metabolismo transcelular), los mecanismos fisiopatológicos de regulación de su síntesis y actividad biológica, y la contribución de las diferentes vías metabólicas del AA y otros ácidos grasos (ciclooxigenasa, 5-, 12- y 15-lipoxigenasas, monooxigenasas...) en cada momento evolutivo y tipo morfológico de las lesiones de psoriasis.

La psoriasis no sólo es una enfermedad dermatológica de elevada prevalencia e impacto sanitario, económico y social, sino que constituye un modelo de alteración de la respuesta inflamatoria, inmunológica y proliferativa, en el que están representados los mecanismos básicos de respuesta celular y biológica. El desarrollo de la investigación en este campo trasciende el marco de la enfermedad y constituye otro ejemplo de la contribución de la Dermatología, en su interacción con otras disciplinas, al avance del conocimiento médico y científico en general.

5.2. IMIDAZOLES

Como consecuencia de los estudios efectuados con bifonazol, clotrimazol y ketocanazol, se ha demostrado el efecto inhibitor de los tres imidazoles sobre la 5-lipoxigenasa de PMN humanos, siendo los correspondientes IC_{50} de 20, 15 y 100 μ M aproximadamente. La

potencia de los dos primeros es similar a la del lonapalene, cuya eficacia en el tratamiento tópico de la psoriasis se ha discutido previamente en el apartado 5.1, mientras que el ketoconazol se demuestra como un inhibidor menos potente de la 5-lipoxigenasa. Estos resultados confirman la actividad inhibitoria del ketoconazol sobre la 5-lipoxigenasa, que se había demostrado previamente en otro modelo celular (PMN de peritoneo de rata) [417]. La IC_{50} del ketoconazol observada en el mencionado estudio, unos 30 μ M, se encuentra en el rango de la hallada empleando PMN humanos estimulados con A23187. La diferencia entre ambos estudios puede atribuirse a la especie de origen así como a las condiciones de incubación, especialmente la mayor concentración de sustrato en el estudio de Beelens et al. [417]. Por lo que respecta al bifonazol y el clotrimazol, si bien cabía suponer su actividad inhibitoria sobre la 5-lipoxigenasa por su pertenencia a la familia de compuestos imidazólicos, no hemos encontrado en la literatura estudios previos semejantes al que aquí se presenta, que demuestra la mayor potencia del bifonazol y el clotrimazol con respecto al fármaco patrón de los imidazoles de utilidad clínica, el ketoconazol. Tampoco existen antecedentes del estudio sobre la inhibición de la ω -oxidación del LTB_4 , que se ha demostrado en el rango de concentraciones similar al que produce la inhibición de la 5-lipoxigenasa en PMN humanos (50 - 100 μ M). Cabía esperar este efecto dada la actividad inhibitoria de los imidazoles sobre el citocromo P-450, que determina su mecanismo de acción como antifúngicos [419] y que según evidencias recientes podría constituir el sistema enzimático responsable de la ω -oxidación del LTB_4 [478].

Por lo que respecta al efecto de los imidazoles estudiados sobre las vías metabólicas del AA en las plaquetas humanas, se ha observado su actividad inhibitoria sobre la tromboxano sintetasa, siendo las IC_{50} y potencia relativa similares a las observadas en el caso de la 5-lipoxigenasa de PMN. Destaca la potencia del bifonazol como inhibidor de la tromboxano sintetasa ($IC_{50} = 7 \mu$ M)

en comparación con el ketoconazol ($IC_{50} = 100 \mu M$), si bien es de escasa relevancia con respecto a las posibles consecuencias clínicas de su efecto sobre las vías metabólicas activas en los queratinocitos, entre las que no se incluye la tromboxano sintetasa. En el estudio de Boetens et al. se observó asimismo un efecto inhibitorio del ketoconazol sobre la tromboxano sintetasa en plaquetas humanas ($IC_{50} = 40 \mu M$), sin que se detectara efecto alguno sobre la ciclooxigenasa o la síntesis de 12-HETE [417]. Por el contrario, en el presente estudio se observó una ligera actividad inhibitoria de los tres imidazoles sobre la ciclooxigenasa, si bien la inhibición más intensa de la síntesis de TXB_2 determinó que en las incubaciones efectuadas con los fármacos se observara un aumento relativo de los picos correspondientes a prostaglandinas, por desviación del sustrato.

La demostración del efecto sobre las vías metabólicas del AA por parte de los imidazoles ensayados en los modelos celulares utilizados tiene interés desde un punto de vista bioquímico. Todos los imidazoles inhiben la formación de productos de la 5-lipoxigenasa en PMN humanos in vitro de forma dependiente de la concentración. En todos los casos la inhibición se produce a nivel de la 5-lipoxigenasa, puesto que se inhibe por igual la formación de LTB_4 , 5-HETE y los isómeros del LTB_4 . Recientemente se han esclarecido algunos aspectos del mecanismo de acción de la 5-lipoxigenasa, que requiere para su activación por A23187 en la célula intacta la translocación a la membrana celular mediante la acción de una proteína [229,230] que se puede inhibir específicamente [232]. Existen datos que indican que los imidazoles actúan directamente sobre la 5-lipoxigenasa, puesto que el efecto inhibitorio del ketoconazol se mantiene en sobrenadantes de homogenados de PMN [417]. Ello excluiría asimismo otros mecanismos indirectos, tales como la interacción con el ionóforo A23187, como ocurre en el caso del benoxaprofen [392]. Sin embargo, la demostración exacta del mecanismo de acción de los imidazoles sobre la 5-lipoxigenasa

requiere de estudios adicionales.

La interacción de los derivados imidazólicos con el citocromo P-450 constituye la base de su mecanismo de acción antifúngico, que ha sido el determinante principal del desarrollo de esta familia de compuestos. El citocromo P-450 es una familia de hemoproteínas que catalizan la síntesis y metabolismo de una gran variedad de compuestos lipofílicos endógenos y exógenos, tales como los ácidos grasos, los esteroides, las hormonas esteroideas sexuales, los glucocorticoides, mineralocorticoides, la vitamina D, los leucotrienos y el ácido retinoico [419]. Los isoenzimas del citocromo P-450 no sólo están presentes en las células de los mamíferos, sino que también intervienen de modo fundamental en el metabolismo de diversos microorganismos, entre los que se incluyen los hongos y los protozoos. Todos los hongos y determinados protozoos dependen completamente de la biosíntesis endógena de ergosterol para mantener la estructura de sus membranas celulares. La vía de biosíntesis del ergosterol incluye la 14 α -desmetilación del lanosterol, dependiente del P-450, que es el paso que inhiben los antifúngicos azólicos (imidazoles y triazoles), dando lugar al acúmulo de esteroides anormales que ejercen un efecto tóxico sobre las membranas celulares [419].

Existen evidencias de que los fármacos inhibidores del citocromo P-450, tales como la metirapona, pueden ser capaces de inhibir la 5-lipoxigenasa en PMN, de forma dependiente de la concentración [579]. No se descarta que enzimas dependientes del citocromo P-450 puedan catalizar reacciones de lipoxigenación del AA [196], y posiblemente existan similitudes estructurales en el centro activo de los correspondientes enzimas que determinen la actividad inhibitoria de algunos imidazoles sobre el citocromo P-450 y la 5-lipoxigenasa. En este sentido es interesante observar que el bifonazol, que demostró la mayor actividad inhibitoria de la 5-lipoxigenasa de PMN humanos en el presente estudio, es el antifún-

gico azólico que presenta una mayor afinidad por el citocromo P-450 microsomal de mamífero [480]. Esta correlación, si se confirmara, podría dificultar el desarrollo de inhibidores eficaces de la 5-lipoxigenasa activos por vía sistémica, puesto que la toxicidad de los derivados azólicos también parece estar en relación con su afinidad por el citocromo P-450 de mamífero. Por otra parte, si bien se considera que la 5-lipoxigenasa es un enzima citosólico, recientemente se ha demostrado que su activación en células inlactas por el ionóforo A23187 implica su translocación a la fracción membrana de la célula [229], donde también se localiza la actividad del P-450.

La inhibición de la 5-lipoxigenasa por un derivado azólico, aplicado por vía tópica, podría determinar una menor biosíntesis de LTB_4 por los PMN presentes en la lesión de psoriasis, determinando una menor quimiotaxis y exocitosis de PMN y la normalización de la proliferación de queratinocitos.

Otro hallazgo interesante del presente estudio es la actividad inhibitoria sobre la ω -oxidación del LTB_4 en PMN humanos por parte de los imidazoles ensayados, en un rango de concentraciones similar al que determina la inhibición de la síntesis de LTB_4 por la 5-lipoxigenasa.

El catabolismo del LTB_4 da lugar a metabolitos menos activos; una vía principal de dicho catabolismo consiste en la ω -oxidación del LTB_4 , dando lugar a 20-OH- LTB_4 , que ulteriormente se oxida dando lugar a 20-OH- LTB_4 . Los demás derivados dihidroxilados del AA prácticamente no se metabolizan por esta vía metabólica, cuya actividad se ha demostrado en los PMN [481] y los cultivos de queratinocitos humanos [478]. Puesto que en general se ha observado que las tasas de síntesis y catabolismo del LTB_4 son comparables, se asume que la ω -oxidación determina en gran manera la cantidad de LTB_4 biológicamente activo que puede acumularse en el medio

circundante a los PMN humanos [481]. La naturaleza exacta del enzima responsable de la ω -oxidación del LTB₄ en los PMN humanos se desconoce, si bien su inhibición específica y reversible por el monóxido de carbono [482] indica que esta reacción es catalizada por enzimas dependientes del citocromo P-450.

La inactivación del LTB₄ dependiente del citocromo P-450 por parte de los queratinocitos puede tener importantes implicaciones como factor limitante de los efectos proinflamatorios y proliferativos del LTB₄ en la epidermis (psoriásica), en la que podrían existir alteraciones en cuanto a la tasa de catabolismo del LTB₄. Se ha propuesto recientemente la hipótesis de que el efecto de los UVB en el tratamiento de la psoriasis pudiera venir dado en parte por la fotodegradación del LTB₄ [381,382]. Invirtiendo el argumento, la demostración del efecto inhibitor de los imidazoles ensayados sobre la ω -oxidación del LTB₄, si se confirmara en células epidérmicas humanas, podría tener implicaciones negativas en cuanto a su posible efecto terapéutico como tratamiento tópico de la psoriasis, por lo que se han puesto en marcha estudios con vista a confirmar o descartar esta posibilidad.

Otra posible implicación del efecto inhibitor de los derivados imidazólicos ensayados sobre actividades enzimáticas relacionadas con el citocromo P-450, y que pueden intervenir en el metabolismo del AA, hace referencia al posible origen de los estereoisómeros del 12-HETE presentes en concentraciones elevadas en las lesiones de psoriasis, como ya se ha discutido con respecto al lunapalene. La reciente observación de que el 12-HETE presente en las escamas de lesiones psoriásicas no corresponde predominantemente al enantiómero 12(S)-hidroxi producido por la 12-lipoxigenasa, sino que puede tratarse del isómero 12(R) [324], cuya actividad quimiotáctica es mayor que la del 12(S)-HETE [470,471], sugiere que en la epidermis inflamada pudiera estar activado otro enzima diferente de la 12-lipoxigenasa. Por ejemplo, se ha descrito que

el 12(R)-HETE es el producto predominante del AA en el tejido hepático, cuando se metaboliza a través de las monooxigenasas dependientes de P-450 [475]. Sin embargo, existen datos en contra de la actividad de esta vía metabólica en la epidermis, tanto humana [472,476] como murina [477].

Recientemente se ha publicado un estudio exhaustivo del metabolismo del AA en suspensiones de células epidérmicas normales [276], en el que se ha demostrado la actividad predominante de un nuevo sistema enzimático, una monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 asociada a la membrana, de localización probablemente mitocondrial, que genera 12-HETE, con predominio del estereoisómero 12(S). El predominio del 12(R)-HETE en las escamas podría corresponder a una degradación posterior a la síntesis [476], de modo que las proporciones de ambos estereoisómeros observadas en las escamas no corresponderían a la verdadera ratio de síntesis en la epidermis.

La confirmación de esta vía metabólica y el hallazgo de un efecto inhibitorio de los derivados imidazólicos sobre la misma podría tener importantes implicaciones terapéuticas, puesto que el 12-HETE es el principal eicosanoide producido por los queratinocitos humanos, existen evidencias de que interviene en la fisiopatología de la psoriasis, y existe escasa experiencia en cuanto a la modulación farmacológica de su síntesis por la escasa disponibilidad de inhibidores de la 12-lipoxigenasa, a excepción de inhibidores duales de la 5- y la 12-lipoxigenasa tales como el L-651,896, en fase preliminar de investigación [472,474]. Por consiguiente, el desarrollo de hipotéticos derivados imidazólicos con una importante actividad inhibitoria sobre la monooxigenasa dependiente de P-450 podría representar una contribución muy importante al tratamiento tópico de la psoriasis.

De hecho, la posible utilidad de los derivados imidazólicos en el tratamiento de la psoriasis viene avalada por la existencia de

publicaciones en la literatura que describen la eficacia terapéutica del ketoconazol [483,484], y otros derivados imidazólicos [485-487] en la psoriasis y la seborrasis, en base a su efecto antimicótico [483] o la inhibición de las respuestas inmunes frente a los antígenos fúngicos, mediada por linfocitos T [488]. El descubrimiento del efecto inhibitor del ketoconazol sobre la 5-lipoxigenasa [417] y por consiguiente sobre la síntesis de LTB_4 , cuyo papel en la fisiopatología de la psoriasis ha sido ampliamente discutido en el apartado 1.8 de la Introducción, proporcionó otra clave acerca del mecanismo de su posible efecto antipsoriático. La elección del bifonazol como fármaco a ensayar en el presente estudio se basó de hecho en el conocimiento de su eficacia en el tratamiento de la seborrasis [489] y de su actividad antiinflamatoria [418], que se sospechó que pudiera estar en relación con una mayor inhibición de la síntesis de LTB_4 , como se ha confirmado. La posible utilidad clínica de los derivados imidazólicos en el tratamiento tópico de la psoriasis se ha confirmado recientemente en un ensayo clínico utilizando R 68 151 a la concentración del 2% [402]. Este derivado imidazólico es un potente inhibitor, aparentemente selectivo, de la 5-lipoxigenasa [490].

La demostración del efecto inhibitor de la 5-lipoxigenasa por parte de diversos imidazoles, cuya potencia varía posiblemente en relación con su estructura química, y la posibilidad de que actúen como inhibidores de la monooxigenasa presente en la epidermis, justifica el desarrollo de nuevos derivados imidazólicos y su ensayo clínico en el tratamiento tópico de la psoriasis. Los resultados obtenidos en el presente estudio determinarán la realización de ulteriores investigaciones destinadas a comprender mejor el mecanismo de acción sobre los enzimas implicados, el posible papel de la ω -oxidación del LTB_4 en el queratinocito y el leucocito polimorfonuclear con respecto a la patogenia de la psoriasis y otras dermatosis inflamatorias, y la relación entre la estructura química de los imidazoles y su actividad, con vistas al

desarrollo de los derivados idóneos para el tratamiento de las mencionadas dermatosis.

6.3. CICLOSPORINA A

La ciclosporina constituye el arma terapéutica de más reciente introducción en el tratamiento de la psoriasis. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de su acción en esta enfermedad, se postula que la ciclosporina actúa principalmente como inmunosupresor corrigiendo las alteraciones inmunológicas descritas a nivel local y/o general en la psoriasis. Sin embargo, al igual que otros agentes terapéuticos eficaces en la psoriasis, la ciclosporina presenta un efecto antiproliferativo que podría explicar en parte su acción en la psoriasis, que se caracteriza por la coexistencia de un componente inflamatorio dermo-epidérmico y un componente de hiperproliferación epidérmica.

Se sabe que la ciclosporina induce una inhibición del crecimiento *in vitro* de diversas líneas linfoides [491,492], células endoteliales [493] y fibroblastos [494]. El efecto de la ciclosporina sobre el crecimiento *in vitro* de queratinocitos epidérmicos ha sido objeto de diversos estudios. Los resultados iniciales fueron contradictorios [495-498], lo que podría ser consecuencia de diferencias entre los estudios en cuanto a la concentración de suero presente en el suero, la duración de la exposición a la ciclosporina o el empleo de la técnica de timidina tritiada para valorar la síntesis de ADN. Empleando la técnica de marcaje con bromodesoxiuridina (BdU) se ha comprobado el efecto inhibitor sobre la síntesis de ADN por parte de queratinocitos humanos cultivados en medio carente de suero, tanto por parte de la ciclosporina A [499] como de la ciclosporina II [500], a concentraciones de 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, en experimentos efectuados con incubaciones cortas (24 a 72 horas).

Se ha demostrado un efecto antiproliferativo directo de la ciclosporina en queratinocitos sometidos a condiciones de hiperproliferación (medio pobre en calcio y carente de suero) [501,502]. La ciclosporina inhibe *in vitro* la síntesis de ADN y la proliferación en cultivos de queratinocitos murinos normales y transformados, así como en la línea celular A431 [503], a concentraciones comprendidas entre 0.3 y 10 µg/mL, similares a las que se encuentran *in vivo* en la piel (6-7 veces superiores a las séricas) de pacientes tratados: 1 a 3 µg/mL [502,504]. Posteriormente se han efectuado estudios que demuestran el efecto inhibitorio de la ciclosporina sobre la síntesis de ADN en queratinocitos humanos, en explantes de piel humana sobre ratón alérgico [505], así como, a la concentración de 10 µg/mL, en cultivos de queratinocitos humanos [499].

Sin embargo, se ha descrito que la adición de suero de ternera inhibe o incluso llega a anular el efecto antiproliferativo de la ciclosporina sobre los queratinocitos en cultivo, probablemente como consecuencia de una menor biodisponibilidad [502], lo que ha planteado dudas sobre la relevancia del efecto antiproliferativo directa de la ciclosporina *in vivo*, por la presencia de proteínas séricas en la epidermis. Recientemente se ha demostrado que la ciclosporina inhibe el crecimiento de queratinocitos epidérmicos humanos en presencia de suero de forma dependiente de la dosis, obteniéndose valores correspondientes al 50% del control a concentraciones comprendidas entre 9.6 y 12 µg/mL [506]. Este efecto inhibitorio de la ciclosporina (sobre la superficie de cultivo) requiere la exposición de los queratinocitos a la ciclosporina durante períodos prolongados de tiempo (6 días).

Un estudio muy reciente ha confirmado el efecto inhibitorio de la proliferación y la captación de timidina tritiada en cultivos de fibroblastos y queratinocitos humanos, por parte de la ciclosporina

A [507]. Este efecto es dependiente de la concentración, aumenta con la duración de la exposición a la ciclosporina, no se inhibe en presencia de suero deslipidizado al 10%, y, en el caso de los queratinocitos, se produce a concentraciones comprendidas entre 1 y 10 µg/mL, dentro del rango terapéutico [507].

El mecanismo de la acción citostática de la ciclosporina A no se conoce con certeza. Algunos estudios han sugerido que inhibe la inducción de la ornitín-decarboxilasa y la síntesis de poliaminas [508], si bien este efecto parece poco específico. También se ha propuesto que la ciclosporina podría actuar inhibiendo la acción de la calmodulina. Sin embargo, recientemente se ha puesto en duda la especificidad de dicha acción [509]. También se ha descrito la disminución por parte de la ciclosporina en el número de receptores epidérmicos para ¹²⁵I-EGF [510], cuya distribución se encuentra alterada en la psoriasis. Existen evidencias de que la ciclosporina actúa sobre el metabolismo del AA en diversos tipos celulares, determinando en parte algunos de los efectos inmunosupresores y nefrotóxicos de dicho fármaco [509]. El efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA, que comparten otros fármacos de utilidad terapéutica en la psoriasis (cf. apartado 1.9), no ha sido suficientemente estudiado, al menos en lo que respecta a los queratinocitos y fibroblastos humanos.

El estudio objeto de la presente discusión se llevó a cabo con el objetivo de investigar el posible efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA en los queratinocitos humanos *in vitro*. La demostración de dicho efecto apoyaría la hipótesis de que el efecto antiproliferativo de la ciclosporina sobre los queratinocitos humanos pudiera venir determinado en parte por la regulación de la síntesis de eicosanoides por los mismos, o bien por otros tipos celulares presentes en las lesiones de psoriasis, y que pudieran intervenir en la fisiopatología de esta enfermedad.

En las condiciones experimentales utilizadas, la incubación breve (15 minutos) con ciclosporina, en el rango de concentraciones que determinan a largo plazo (días) un efecto citostático sobre los queratinocitos humanos, no produce cambios en el metabolismo del AA exógeno en suspensiones de células epidérmicas humanas.

Estos resultados sugieren que la ciclosporina no ejerce un efecto directo a corto plazo (minutos) sobre los enzimas que determinan el metabolismo del AA exógeno en los queratinocitos humanos, a diferencia de lo que al parecer ocurre en otros sistemas celulares, tales como los leucocitos humanos, en los que la incubación durante 20 minutos con ciclosporina, a concentraciones comprendidas entre 0.08 y 8 $\mu\text{g/ml}$, inhibe de forma dependiente de la dosis la actividad de la fosfolipasa A_2 y la síntesis de PGE2 [375].

La falta de efecto de la ciclosporina en el modelo experimental empleado para los estudios que se discuten no podía atribuirse a la presencia de proteínas séricas en el medio, cuyo posible efecto inhibitor ha sido descrito por algunos autores [502]. Posiblemente la acción antiproliferativa de la ciclosporina sobre los queratinocitos dependa de un proceso intracelular con muchas etapas, relacionado con la interacción del fármaco con una proteína citosólica.

En vista de los primeros resultados, se consideró necesario realizar estudios adicionales en modelos de cultivo celular para evaluar la posible modulación a largo plazo (horas - días) del metabolismo del AA endógeno por parte de la ciclosporina y la hipotética contribución de este mecanismo al efecto antiproliferativo del fármaco en diversos tipos celulares *in vitro*. Puesto que en el modelo experimental empleado de cultivo de queratinocitos no fue posible determinar de forma reproducible el metabolismo del AA en las diversas condiciones ensayadas, se consideró interesante determinar el efecto de la incubación a largo plazo (24 horas) con

ciclosporina sobre el metabolismo del AA en cultivos de fibroblastos.

En primer lugar era necesario descartar un efecto tóxico de la ciclosporina sobre los fibroblastos, que alteraría la disponibilidad de sustrato al disminuir el número de células, o bien podría afectar al patrón metabólico del AA por lesión celular. A la vista de los resultados de este estudio preliminar, se eligió el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 5 µg/mL, que no causaron efecto citotóxico alguno sobre los cultivos de fibroblastos en fase de confluencia temprana, para efectuar los experimentos destinados a evaluar el posible efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA exógeno en fibroblastos dérmicos humanos en cultivo.

Los resultados obtenidos demuestran un efecto inhibitor dependiente de la dosis por parte de la ciclosporina sobre la síntesis de PGE_2 y la PGI_2 , los principales productos de la ciclooxigenasa en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos procedentes de piel sana. Si bien no se puede descartar que la respuesta de los cultivos de fibroblastos dérmicos procedentes de piel sana frente a la ciclosporina difiera de la de los fibroblastos procedentes de dermis lesional psoriásica, la similitud cualitativa y cuantitativa entre los patrones metabólicos de ambos en ausencia de fármaco hace poco probable la existencia de un efecto diferencial. Dicha posibilidad no se pudo confirmar dada la escasa disponibilidad de muestras procedentes de piel lesional psoriásica, cuya obtención es por lo demás ardua, y requiere un alto grado de motivación en los pacientes.

Existen publicaciones en la literatura que hacen referencia al efecto de la ciclosporina sobre el metabolismo del AA en diversos tipos celulares: en los leucocitos humanos la ciclosporina produce una inhibición de la fosfolipasa A_2 y de la síntesis de PGE_2 , dependiente de la dosis y más marcada en los linfocitos que en los

PMN [375]; en macrófagos peritoneales activados de rata, la ciclosporina produce asimismo una inhibición directa de la fosfolipasa A_2 , así como de la síntesis de prostaciclina (PGI_2) [374], mientras que otros autores han detectado un bloqueo parcial de la tromboxano sintetasa [511]; en cultivos de células mesangiales de riñón, la ciclosporina inhibe la formación de PGE_2 [512], mientras que en los cultivos de células endoteliales produce una inhibición de la síntesis de PGI_2 [513-516]. El mecanismo de esta inhibición es proximal a la sintetasa de PGI_2 , y no parece deberse a una menor disponibilidad de AA libre en la membrana celular, lo que sugiere que la ciclosporina inhibe la ciclooxigenasa, si bien no se puede excluir un efecto adicional sobre la aciltransferasa [517]. Este efecto inhibitorio de la síntesis de prostaciclina tiene importantes implicaciones en cuanto a la toxicidad de la ciclosporina, tanto a nivel renal [518] como pancreático [519], y ha sido objeto recientemente de intentos de modulación farmacológica mediante la administración de análogos de la PGE_2 [520,521].

La demostración del efecto inhibitorio de la ciclosporina sobre la síntesis de PGE_2 y PGI_2 en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos puede tener importantes implicaciones en cuanto a su efecto antiproliferativo sobre diferentes tipos celulares, y en particular los queratinocitos. Si bien la inhibición de la ciclooxigenasa en los fibroblastos por sí sola no tiene por qué correlacionarse con un efecto antiproliferativo directo del fármaco, como ocurre en el caso de la minocielina [522], los metabolitos del AA sintetizados por los queratinocitos humanos, en especial la PGE_2 , tienen un importante papel en la autorregulación de su proliferación *in vitro*. La inhibición farmacológica de la síntesis de PGE_2 determina una disminución del 40% en la tasa de proliferación de cultivos no confluentes de queratinocitos, mientras que no se producen alteraciones en los cultivos en fase de confluencia, que pese a una mucho menor síntesis de PGE_2 continúan proliferando rápidamente hasta hacerse estratificados [253]. El patrón metabólico y

proliferativo de los cultivos no confluentes podría ser similar al de la epidermis en dermatosis inflamatorias e hiperproliferativas como la psoriasis, en la que la PGE₂ podría actuar como promotor de la proliferación. Sin embargo, se ha descrito el efecto inhibitorio de la proliferación en explantes de epidermis humana por parte de la PGE₂ [523], así como el efecto terapéutico de la PGE₂ tópica en la psoriasis en placas [356], que si bien requieren ulterior confirmación y estudio, parecen indicar el carácter demasiado simplificado de la mencionada hipótesis. En cualquier caso, la modulación de la proliferación de los queratinocitos por diversos eicosanoides y el papel de la misma en la fisiopatología de la psoriasis parecen claros, y la demostración del efecto de la ciclosporina sobre la síntesis de prostaglandinas por los fibroblastos dérmicos humanos indica un posible mecanismo de acción farmacológica escasamente explorado, y con potenciales implicaciones terapéuticas.

En la psoriasis, la presencia de alteraciones en el metabolismo del AA a nivel cutáneo puede ser parcialmente responsable, tanto del mantenimiento de una situación hiperproliferativa en la epidermis, como de la presencia de los cambios inflamatorios que caracterizan a las lesiones, especialmente en sus primeras fases. Por otra parte, la normalización de estas alteraciones puede correlacionarse en ocasiones con la mejoría clínica. Se ha descrito una reducción del 64% en los niveles de LTB₄ presentes en las lesiones de pacientes psoriásicos que respondieron al tratamiento con ciclosporina [373]. Esta reducción, si bien podría ser secundaria a la normalización de la epidermis psoriásica como consecuencia de la acción terapéutica de la ciclosporina, también podría ser un efecto directo de este fármaco, resultante de su actividad inhibitoria sobre la fosfolipasa A₂, detectada en diversos modelos celulares [374,375], o de otros efectos sobre el metabolismo del AA en los tipos celulares que intervienen en la psoriasis, ya sean queratinocitos, fibroblastos o células inflamatorias.

La demostración de que la incubación de cultivos de fibroblastos dérmicos humanos en presencia de ciclosporina durante 24 horas inhibe la actividad de la ciclooxigenasa en dicho tipo celular de forma dependiente de la dosis, induce a pensar que, al menos en parte, la efectividad de la ciclosporina en la psoriasis pudiera venir determinada por la modulación del efecto regulador de diversos eicosanoides sobre la proliferación epidérmica y posiblemente la respuesta inflamatoria. Dichos eicosanoides, tales como la PGE_2 , o posiblemente determinados productos de la 15-lipoxigenasa, podrían ser sintetizados por los queratinocitos de la propia epidermis -regulación autocrina- o por los fibroblastos de la dermis (psoriásica) -regulación paracrina-. La ciclosporina podría actuar modulando los mecanismos de regulación de la proliferación de los queratinocitos epidérmicos por ambas vías, ya fuera inhibiendo la síntesis de factores peptídicos de crecimiento, como se ha demostrado recientemente en el caso del factor de crecimiento de los fibroblastos básico [524], ya fuera inhibiendo la síntesis de mediadores lipídicos como los eicosanoides, y en concreto la PGE_2 y/o la PGI_2 , por parte de los fibroblastos dérmicos, tal como parecen indicar los resultados del presente estudio, o por parte de los propios queratinocitos de la epidermis. Esta última posibilidad no se puede descartar, puesto que el modelo experimental utilizado no permite evaluar el posible efecto a largo plazo de la incubación con ciclosporina sobre el metabolismo del AA en cultivos de queratinocitos o en la propia epidermis humana, psoriásica o no.

Por consiguiente, la realización de estudios más extensos para aclarar estos posibles mecanismos de acción de la ciclosporina sobre los fibroblastos, las células inmunocompetentes o en especial los queratinocitos presentes en la lesión psoriásica, que complementarían el efecto inmunosupresor de dicho fármaco, constituye un objetivo de gran interés en la investigación dermatofarmacológica.

con vistas al mejor conocimiento del mecanismo de acción terapéutica de la ciclosporina y el posible desarrollo de nuevos derivados sin acción inmunosupresora que mantengan su eficacia en la psoriasis.

6.4. PROTOCOLO ACIDO EICOSAPENTENOICO

El presente estudio demuestra la eficacia (moderada) de la suplementación dietética con aceite de pescado durante 8 semanas como tratamiento de la psoriasis en placas crónica estable de intensidad moderada. La mejoría observada en el curso del período de tratamiento alcanza significación estadística incluso en comparación con la mejoría que tiende a producirse (espontáneamente, por el propio curso de la enfermedad?) en el grupo control tratado con aceite de oliva (la composición porcentual y en ácidos grasos de cuya dieta, durante el período de tratamiento, se asemeja a la dieta mediterránea estándar).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, desde el punto de vista clínico, deben evaluarse a la luz de los diversos estudios publicados previamente o en el transcurso de su realización, en los que se observa una considerable variabilidad.

En el primer estudio publicado [442], que fue abierto y no controlado, 8 de 13 pacientes presentaron una respuesta clínica, consistente en una mejoría ligera a moderada de las placas de psoriasis, al cabo de 8 semanas de tratamiento con una dieta suplementada con aceite de pescado (entre 11 y 14 g/día de EPA y 7 y 9 g/día de DHA). La respuesta clínica se correlacionaba con la presencia en el contenido lipídico de la epidermis de un cociente EPA/DHA elevado con respecto a los pacientes que no respondieron.

Posteriormente se han efectuado otros estudios abiertos, con

resultados contradictorios. Se ha observado una respuesta moderada en el grado de eritema y descamación, en 8 de 10 pacientes con psoriasis resistente al tratamiento, tras la administración de una dosis de Max-EPA equivalente a 12 g/día de EPA (la dosis implícita de DHA era de 8 g/día), asociada a una reducción en la ingesta de grasas, durante un mínimo de 6 semanas [445]. En este estudio también se observó una reducción significativa en la producción de LTB_4 por los PMN de los pacientes.

En otro estudio [446], efectuado sobre 26 pacientes tratados con dieta libre suplementada con una dosis de Max-EPA equivalente a 3.2 g/día de EPA y 2.2 g/día de DHA, sólo se observó mejoría (aunque fue notoria) en una paciente con psoriasis pustulosa.

En un estudio reciente [448] se ha observado la eficacia del tratamiento a largo plazo (4 meses) con una dieta pobre en grasas suplementada con una dosis diaria de 5.4 g de EPA y 4.8 g de DHA, con una respuesta "moderada" a "excelente" en 15 de 26 pacientes, aunque sólo en 5 de 12 pacientes con afectación superior al 10% de la superficie corporal. Se evaluó la producción de leucotrienos por parte de los PMN de los pacientes, mediante la determinación de los cocientes LTB_5/LTB_4 , que tendieron a ser menores en los pacientes que respondieron, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En otro estudio [449] se observó una mejoría "moderada a excelente" en 10 de 18 pacientes con psoriasis en placas estable durante 2 semanas, sin indicar la extensión de la enfermedad, a los que se administró una dieta pobre en grasas suplementada con una dosis diaria de 540 mg de EPA, 360 mg de DHA, ácido linoleico y α -linolénico. En los pacientes que mejoraron, la mejoría se empezó a observar a partir del primer mes de tratamiento, y fue máxima a los cuatro meses.

Recientemente se han publicado los resultados de un estudio abierto [450] efectuado sobre 9 pacientes japoneses, a quienes se administraron diariamente 3.6 g de EPA en forma de etiléster purificado al 90%, durante periodos de tiempo comprendidos entre 3 y 6 meses, sin efectuar modificación dietética alguna y manteniendo el tratamiento tópico habitual. La dosis utilizada se eligió en base a la demostración previa por los mismos autores de un efecto reductor sobre la síntesis de LTB_4 por PMN estimulados con A23187, con un aumento de la síntesis de LTB_4 y una disminución de la actividad quimiotáctica de los neutrófilos, en voluntarios sanos tratados con dicha dosis [525]. En el mencionado estudio [450] se observó una mejoría clínica a partir del segundo mes de tratamiento, que llegó hasta un 50% al sexto mes, apreciándose un aumento significativo en el cociente plasmático EPA/AA y el cociente $\text{LTB}_4/\text{LTC}_4$ producido por neutrófilos estimulados con A23187, que tendía a correlacionarse negativamente con la mejoría clínica.

Los resultados de los estudios controlados han sido igualmente contradictorios, probablemente a consecuencia de diferencias metodológicas.

En un estudio randomizado, a doble ciego, controlado con placebo (cápsulas de aceite de oliva), se suplementó la dieta habitual de 28 pacientes con psoriasis en placas crónica estable, que mantuvieron su tratamiento tópico habitual, con 1.8 g/día de EPA (la dosis implícita de DHA era de 1.2 g/día), observándose a las 8 semanas una mejoría significativa en el prurito y el grado de descamación de los pacientes tratados [444]. En el resumen de una comunicación del mismo grupo, correspondiente a los resultados preliminares del estudio, se afirmaba la existencia de una diferencia significativa en el grado de prurito y la superficie corporal afectada en el grupo tratado (12 pacientes) [443].

En otro estudio de características análogas, excepto por la

prohibición del tratamiento corticosteroide tópico durante los dos meses previos al inicio del estudio [447], no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta clínica entre el grupo experimental (n=13) y el grupo control (n=14).

Las causas de la variabilidad de los estudios previos pueden ser diversas: en primer lugar, los estudios abiertos son mucho más difíciles de evaluar en cuanto a eficacia por la ausencia de un grupo control y un protocolo a doble ciego; por otra parte existen diferencias importantes en cuanto a la duración de los estudios, la dosis diaria de EPA administrado, el control o no de la dieta y la permisón del tratamiento conyuvante, que impide evaluar la eficacia del aceite de pescado como monoterapia. Sin embargo, del análisis de la siguiente Tabla, que resume los aspectos esenciales de los principales estudios previos, puede inferirse que el principal factor determinante de la eficacia clínica del tratamiento es la dosis diaria de EPA y la duración total del periodo de tratamiento.

Dosis diaria EPA	Grado mejoría	Ref.
10.8 - 13.5 g x 2m	moderada	[442]
9 - 12 g x 3m	mejoría en mayoría	[445]
5.4 g x 4m	moderada a marcada	[448]
3.6 g x 6m	moderada a marcada	[450]
3.2 g x 2m	sin efecto	[446]
1.8 g x 3m	cierto efecto	[443,444]
1.8 g x 2m	sin efecto	[447]

Por otra parte, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio efectuado a doble ciego, equiparando a los pacientes en cuanto a tipo, extensión y actividad de la psoriasis, incluyendo en el protocolo un control de la dieta y el tratamiento conyuvante, y

evaluando diversos parámetros de respuesta clínica, histológica y bioquímica. El cumplimiento de estas condiciones en el presente estudio permite calibrar la importancia de su contribución al conocimiento de la eficacia del tratamiento dietético de la psoriasis en placas estable.

Si bien las diferencias entre grupos por lo que respecta al PASI no alcanzan la significación estadística, ello se debe con toda probabilidad al escaso número de pacientes incluidos en cada grupo. Sin embargo, llama la atención la tendencia a la mejoría observada asimismo en el grupo de control, a diferencia de lo que ocurre en otros estudios [444]. Ello podría deberse a las características específicas de la muestra de pacientes, de la cronología de inclusión en el estudio o del protocolo, dieta o tratamiento coadyuvante utilizado. Si bien carecemos de datos para analizar este efecto, parece importante ampliar en futuros estudios el número de pacientes, la duración del tratamiento y el análisis del posible efecto de la dieta por se sobre la actividad clínica de la psoriasis.

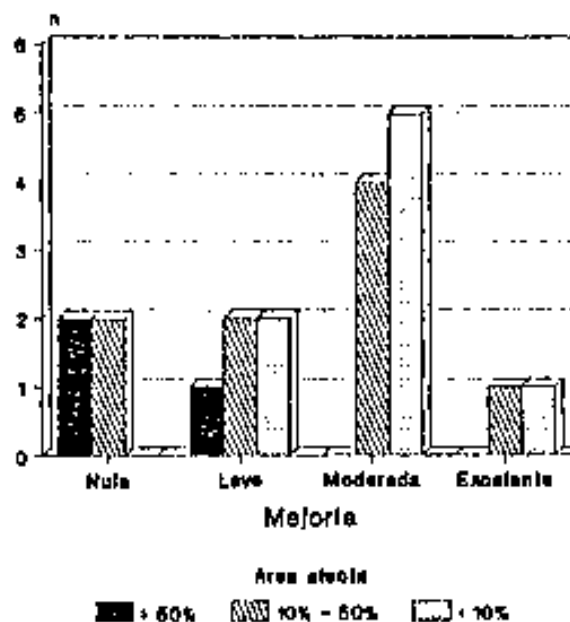
El hallazgo de una mejoría clínica estadísticamente significativa en el grupo tratado con aceite de pescado, pese al escaso número de pacientes incluidos en cada grupo y la tendencia (natural?) de los enfermos con psoriasis en placas "estable" a la mejoría clínica con el transcurso del tiempo, se puede atribuir en parte con gran probabilidad a los criterios de inclusión en el estudio, que restringían la participación a pacientes con psoriasis en placas estable, con un PASI comprendido entre 10 y 50 (promedio aproximado: 20). Ello dio lugar a la inclusión en el estudio de un grupo homogéneo de pacientes, a excepción del caso atípico (JEL) que fue excluido a posteriori, al demostrarse que se trataba de un caso de psoriasis severa e inestable (evolucionó a eritrodermia, requiriendo ingresos hospitalarios), si bien al principio del estudio cumplía los criterios de inclusión. En este grupo homogéneo de

pacientes se produjo en el transcurso del tratamiento una mejoría progresiva relativa moderada (en promedio, un 60% en el grupo tratado con aceite de pescado, un 30% en el grupo tratado con aceite de oliva, a la 8ª semana).

Estos resultados avalan la impresión obtenida en estudios previos efectuados por otros autores [448], que observaron que la respuesta clínica en pacientes tratados durante 2 meses con 5.4 g/día de EPA era mejor en los pacientes con un porcentaje de superficie corporal afecta inferior al 50%, y especialmente en aquellos pacientes que presentaban menos de un 10% de superficie corporal afecta al principio del estudio (Fig. 6.4.1).

Por otra parte, si bien el índice PASI es una variable bien contrastada para la valoración clínica de la respuesta de la psoriasis al tratamiento [526], es interesante observar la utilidad de una escala clínica de evaluación del grado de eritema, infiltración y descamación, que si bien no tiene en cuenta la superficie corporal afecta (uno de los parámetros de más difícil cuantificación exacta en la práctica clínica cotidiana) traduce adecuadamente la mejoría observada en el grupo

Relación extensión - respuesta clínica
Kragballe & Fogh 1989



EPA 5.4 g, DHA 4.8 g
2 meses de tratamiento

Fig. 6.4.1. Relación entre la superficie corporal afecta y el grado de mejoría clínica en pacientes psoriásicos tratados con aceite de pescado [Ref. 448].

de tratamiento con aceite de pescado, no existiendo un claro predominio de la misma en ninguno de los tres parámetros evaluados.

Por el contrario, la evaluación de los parámetros histológicos en biopsias procedentes de placas de psoriasis no se correlacionó de forma significativa con la respuesta clínica, salvo en el grado de acantosis epidérmica a la 82 semana de tratamiento, que sí disminuyó significativamente en el grupo tratado con aceite de pescado. La falta de diferencias significativas en cuanto al grosor de la capa córnea y el espesor de la placa suprapapilar tal vez pudiera atribuirse al tratamiento emoliente común a ambos grupos en el primer caso, y a las variaciones de la segunda en situaciones de mayor actividad inflamatoria de las placas de psoriasis, que no corresponderían a las lesiones crónicas de los pacientes incluidos en el estudio, con psoriasis estable durante por lo menos dos semanas antes de su entrada en el protocolo. Con independencia de las dificultades técnicas que implica efectuar cortes exactamente perpendiculares a la superficie cutánea y obtener biopsias en zonas comparables de placas idénticas, en especial teniendo en cuenta la existencia de "hot spots" de mayor actividad en las placas de psoriasis [527], la determinación de la distancia entre las crestas interpapilares y la capa granulosa se ha demostrado como un buen parámetro histológico para evaluar la respuesta al tratamiento de las lesiones de psoriasis. En futuros estudios será conveniente tener en cuenta la utilidad en morfometría del análisis de imágenes computerizado y la evaluación del grado de acantosis, o cociente de las determinaciones obtenidas en piel lesional y piel normal, en biopsias de control [528].

Si bien en el presente estudio se observó una mejoría significativa para los diversos parámetros clínicos evaluados en la 89 semana de tratamiento con aceite de pescado, es probable que las diferencias con respecto al grupo control aumentaran al prolongar la duración del período de tratamiento, como sugieren algunos estudios de

tratamiento a largo plazo, en los que la mejoría clínica se hace más notoria a partir del 2º mes de tratamiento, y se mantiene posteriormente [450,529]. Sin embargo, la elección de la dosis y duración del tratamiento no sólo se basó en consideraciones clínicas, sino también en los conocimientos actuales del efecto bioquímico de la sustitución de los ácidos grasos de la dieta por ácidos grasos ω -3 sobre el metabolismo del AA [431] en los tipos celulares presuntamente implicados en la fisiopatogenia de la psoriasis, tanto por lo que hace referencia a la cronología de los mismos como a su dependencia de la dosis de EPA y DHA, como se discute más adelante.

No se detectaron efectos adversos en el presente estudio, lo que concuerda con la experiencia de diversos autores [441,443-445,447, 529]. Empleando dosis elevadas de aceite de pescado (10.8 - 13.5 g/día de EPA), algunos pacientes presentan flatulencia y eructos con sabor a pescado [442]; sin embargo, cuando el aceite de pescado se administra en cápsulas gelatinosas, como en el presente estudio, este efecto secundario es mínimo o no se produce [529]. También se puede disimular el sabor a pescado incorporando pequeñas cantidades de esencia de menta [444].

Una complicación potencialmente más grave de la administración de aceite de pescado se ha descrito en pacientes tratados durante 2 años a la dosis de 3.6 g/día de EPA, cuyo tiempo de sangría fue superior al de los pacientes a los que se administró la dosis de 1.8 g/día [530]; por otra parte, se ha descrito una disminución en la agregación plaquetar inducida por colágeno en voluntarios tratados con 6 g/día de EPA durante 6 días [425]. Las implicaciones clínicas de estos datos no están claras; en un estudio se demostró que el efecto sobre las plaquetas de la administración de 10 g/día de EPA durante 1 mes fue menor que el que produce la ingesta diaria de 325 mg de aspirina [531]. Por otra parte, existen evidencias de un estado de hiperagregabilidad plaquetar en los pacientes con

psoriasis [290,292,532], que pudiera corregir la administración de aceite de pescado, si bien este aspecto no ha sido objeto de evaluación específica en el presente estudio. En principio parece aconsejable no administrar aceite de pescado a pacientes con diátesis hemorrágica o sometidos a tratamiento antiagregante plaquetar.

Si bien en el presente estudio no se han podido detectar alteraciones significativas en cuanto a los parámetros analíticos del perfil lipídico de los pacientes, la administración de aceite de pescado puede alterar los niveles de lípidos y lipoproteínas séricas, si bien estos efectos son dependientes de la dosis y de la presencia o no de dislipemia. Empleando dosis elevadas de aceite de pescado (75 a 100 g/día, sustituyendo más que suplementando la ingesta dietética de ácidos grasos y administrando el equivalente a más de 10 g/día de EPA) se ha observado una reducción de los niveles de triglicéridos y colesterol total y asociados a VLDL y LDL en voluntarios sanos y pacientes con hiperlipidemias tipos IIb y V [533-535]. Se han conseguido resultados similares empleando dosis inferiores (12 a 20 g/día de aceite de pescado) durante periodos de tiempo más prolongados (6 a 12 semanas) [530], habiéndose demostrado asimismo la eficiencia del tratamiento dietético con suplementos de aceite de pescado en pacientes con hipertrigliceridemia, con un aumento en los niveles de colesterol asociado a LDL [536,537], de forma comparable a lo que ocurre en pacientes hipertriglicéridémicos tratados con fibratos. Por el contrario, en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia no se obtiene ningún efecto significativo [538].

Puesto que en los pacientes con psoriasis se ha descrito la presencia de niveles elevados de triglicéridos asociados a VLDL y LDL con respecto a controles sanos de edad equiparable [539], el tratamiento dietético con aceite de pescado podría tener un efecto beneficioso adicional sobre la hiperlipoproteinemia en los

pacientes psoriásicos, lo que requiere un estudio en profundidad.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la administración de aceite de pescado como suplemento dietético reduce la hipertrigliceridemia inducida por retinoides como el isotretinoíno [540] o especialmente el etretinato [540-542] o el acitretino [542], que constituyen un tratamiento de primera línea en la psoriasis grave. Por consiguiente, el tratamiento coadyuvante con aceite de pescado en estos pacientes da lugar a una normalización del perfil lipídico y posiblemente un moderado efecto terapéutico adicional, además de otros posibles efectos beneficiosos cardioprotectores, disminuyendo la agregabilidad plaquetar, la viscosidad sanguínea e incluso la tensión arterial [543].

Por lo que se refiere al metabolismo del AA endógeno en suspensiones de PMN incubadas en presencia de ionóforo A23187 durante 30 segundos o 5 minutos, en el presente estudio no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento ni con el transcurso del mismo. En consecuencia, puede afirmarse que no se producen variaciones con el tratamiento en cuanto a la velocidad de síntesis de productos de la 5-lipoxigenasa, que se puede evaluar midiendo la producción de los mismos a tiempos de incubación cortos, ni en cuanto a la producción máxima, cuya meseta se alcanza hacia los 5 minutos. Los resultados de las incubaciones a 5 minutos presentan una menor dispersión estadística, lo que los hace más apropiados para evaluar el metabolismo del AA endógeno en ulteriores estudios.

Los resultados del presente estudio concuerdan con los de Kragballe y Fogh [448], quienes tampoco observaron variaciones en la producción de LTB₄ por suspensiones de PMN de pacientes psoriásicos en el transcurso del tratamiento con 5.4 g/día de EPA durante 4 meses. Por otra parte, en estudios comparativos del metabolismo del AA endógeno [285,445], o exógeno (cf. apartado 2.2.3) en suspensio-

nes de PMN procedentes de pacientes psoriásicos y controles, tampoco se ha observado la existencia de diferencias significativas entre ambos.

Todo ello sugiere que el metabolismo del AA endógeno por suspensiones de PMN procedentes de sangre periférica de pacientes psoriásicos tratados con aceite de pescado tal vez no sea un parámetro idóneo para correlacionar la respuesta clínica con la respuesta metabólica. Algunos autores [445] han observado reducciones significativas en la síntesis de LTB_4 por los PMN de sangre periférica en pacientes psoriásicos tratados durante 6 semanas con aceite de pescado, si bien las dosis de EPA (12 g/día) fueron superiores a las empleadas en el presente estudio.

Si bien será importante determinar en el futuro los niveles de LTB_4 producidos *in situ* en las lesiones de psoriasis, se debe tener en cuenta que los niveles de LTB_4 detectados en escamas de psoriasis no se correlacionan bien con la respuesta clínica [446], y que en un modelo de inflamación experimental, la administración de suplementos de EPA a ratas produjo una inhibición de la síntesis de LTB_4 bastante menor que la de la PGE_2 [544].

Si parece algo más útil la determinación del cociente LTB_5/LTB_4 , cuyo aumento se produce a partir del mes de tratamiento con dosis de 5.4 g/día de EPA [448] o a partir del tercer mes de tratamiento con 3.6 g/día [450], es superior en los pacientes que responden y tiende a preceder y correlacionarse con la mejoría clínica. Posiblemente, a la dosis de EPA empleada en nuestro estudio (2.59 g/día), hubiera sido necesario un período de tratamiento superior a 8 semanas para detectar una posible correlación con la respuesta clínica. Lamentablemente, esta determinación no se pudo efectuar en el presente estudio por carecer de estándar auténtico de LTB_5 que permitiera identificar con certeza el pico correspondiente y cuantificar sus niveles; sin embargo, a semejanza de lo ocurrido

en estudios precedentes [442,445,448,450], en el presente estudio se detectaron de forma sistemática a las 8 semanas de tratamiento nuevos picos cromatográficos en las incubaciones de PMN procedentes de pacientes tratados con aceite de pescado. La detección de estos picos, que corresponden con toda probabilidad a LTB₄ y otros metabolitos de los ácidos grasos ω -3 administrados, que permitiría cuando menos una buena monitorización del cumplimiento de la prescripción y de la absorción del aceite de pescado.

El posible mecanismo de acción del EPA, administrado como suplemento o sustituto dietético del AA, en el tratamiento de la psoriasis, consiste en su competencia con el AA como sustrato de la ciclooxigenasa [432] y la lipoxigenasa [431], disminuyendo la síntesis de eicosanoides proinflamatorios y produciendo diversos metabolitos que son en su mayor parte menos activos biológicamente que los derivados del AA [434-438] o tienen un efecto antagónico sobre los mismos.

Por lo que respecta al DHA presente en el aceite de pescado, se trata de un inhibidor competitivo de la ciclooxigenasa [423], y puede ser metabolizado por la vía de las lipoxigenasas [424], por lo que podría dar lugar a la producción de LTB₄ y 12-HETE, con un efecto contraproducente desde el punto de vista terapéutico en la psoriasis. Sin embargo, se ha demostrado la posibilidad de que el DHA pueda convertirse en EPA *in vivo* [425,426], por lo que el efecto neto del DHA todavía no está completamente aclarado.

Cuando se suplementa la dieta de voluntarios sanos durante 6 semanas con 3.2 g/día de EPA y 2.2 g/día de DHA, se inhibe significativamente la liberación de AA de la membrana celular (38%) y la generación total de leucotrienos y otros productos de la 5-lipoxigenasa (50%) en PMN y monocitos de sangre periférica estimulados con ionóforo A23187, así como la respuesta quimiotáctica (70%) de los primeros al LTB₄ [433].

El LTB₅, metabolito del EPA por la vía de la 5-lipoxigenasa, es mucho menos potente como agente quimiotáctico [545] y estimulador de la proliferación de los queratinocitos [546] que el LTB₄, inhibiendo asimismo las acciones de éste último [433,438,546,547], si bien en un modelo de quimiotaxis inducida por LTB₄ en piel humana no se observa este efecto inhibitor del LTB₅ [548]. También se ha demostrado que el LTB₅ inhibe la síntesis de LTB₄ a partir del AA en los PMN humanos [435], y la combinación del efecto de antagonismo parcial con el de inhibición de la síntesis de LTB₄ sería lo que explicaría mejor el efecto beneficioso del LTB₅ sintetizado a partir del EPA con respecto a los fenómenos de quimiotaxis y activación de los PMN y proliferación de queratinocitos que intervienen en la fisiopatología de la psoriasis.

El metabolismo del EPA a través de la 15-lipoxigenasa epidérmica da lugar a ácido 15-hidroxiicosapentaenoico (15-HEPE) [549,550], mientras que el DHA se transforma en ácido 17-hidroxicosahexaenoico [550]. Estos metabolitos actúan como inhibidores de la 5-lipoxigenasa (IC₅₀ = 25 µM), siendo incluso más potentes que el 15-HEPE, que como ya se ha mencionado puede estar implicado en la fisiopatología de la psoriasis, y cuya eficacia en el tratamiento tópico de esta enfermedad se ha demostrado recientemente [551].

Sin embargo, estas explicaciones del mecanismo de acción antipsoriásica del EPA en base a la menor actividad o incluso el antagonismo de sus metabolitos con respecto al efecto proinflamatorio e hiperproliferativo de los metabolitos del AA, en especial los de la vía de la 5-lipoxigenasa, se deben considerar incompletas, puesto que aparentemente se contradicen con el efecto similar y aparentemente paradójico de la aplicación tópica de ambos ácidos grasos. Por una parte, la aplicación tópica repetida de AA en animales de experimentación produce cambios inflamatorios y proliferativos que se han empleado como modelo de inflamación

experimental en estudios farmacológicos [552], mientras que la aplicación tópica de EPA o DHA en cobayas produce una respuesta hiperproliferativa que se correlaciona con un descenso en los niveles de ácido 13-hidroxioctadecadienoico (13-HODE) -producido por 15-lipoxigenación del ácido linoleico- y es antagonizada por la aplicación tópica del mismo [553]. Por otra parte, es asimismo sorprendente el efecto terapéutico sobre la psoriasis de la aplicación tópica tanto de EPA [554] como de AA [555], que todavía no ha encontrado explicación. Evidentemente son necesarios estudios más amplios, tanto en animales de experimentación como en seres humanos, de las vías metabólicas de los diversos ácidos grasos en la piel y de los efectos e interacciones de los metabolitos producidos por las diversas vías metabólicas (5-, 12- y 15-lipoxigenasas, ciclooxigenasa, monooxigenasas) sobre la fisiopatología de la psoriasis.

En resumen, el empleo terapéutico del aceite de pescado en la psoriasis se basa aparentemente en la substitución en los fosfolípidos de la membrana celular del AA por EPA, y la inhibición por parte del EPA y sus metabolitos de la formación de los eicosanoides, en especial el LTB₄, producido por los PMN, y de la acción de éstos sobre los componentes celulares de las lesiones de psoriasis y/o del infiltrado inflamatorio, si bien estos mecanismos hipotéticos requieren ulteriores investigaciones acerca de los fenómenos que se producen *in situ*.

Por lo que respecta al metabolismo del AA endógeno en suspensiones de plaquetas incubadas durante 10 segundos y 5 minutos en presencia de ionóforo A23187 5 μ M, que no ha sido previamente estudiado en pacientes psoriásicos tratados con aceite de pescado, los resultados obtenidos en el presente estudio son especialmente interesantes. Los tiempos de incubación se seleccionaron en base a los datos del estudio previo (cf. Apartado 2.2.2), a fin de observar las posibles diferencias en cuanto a la velocidad de biosíntesis de los

eicosanoides (10 segundos) y su producción total (5 minutos). Se valoró la producción de dos de los principales eicosanoides sintetizados por las plaquetas a partir del AA: el HHT como indicador de la actividad global de la ciclooxigenasa plaquetar y el 12-HETE como indicador de la actividad de la 12-lipoxigenasa plaquetar.

En el presente estudio se observa, en el caso de los pacientes tratados con aceite de pescado, una disminución en la producción plaquetar máxima de eicosanoides por ambas vías metabólicas, especialmente significativa en el caso del 12-HETE, y que tiende a correlacionarse con la mejoría clínica, mientras que en el grupo de pacientes tratados con aceite de oliva se aprecia un aumento significativo en la producción de HHT y 12-HETE en la semana 8 con respecto a la semana 0 del protocolo.

Una posible explicación de estos resultados en el grupo tratado con aceite de pescado se basaría en la sustitución del AA por EPA a nivel de la membrana plaquetar, con un posible efecto inhibitor de la liberación del AA por parte del EPA, a semejanza de lo que ocurre en el caso de los PMN y los monocitos [431], lo que dejaría menos sustrato disponible (AA libre) para su conversión en 12-HETE y productos de la ciclooxigenasa plaquetar. Por otra parte, no se puede descartar la contribución de la pequeña cantidad de DHA presente en el aceite de pescado (0.55 g/día) a través de su conversión en EPA [425,426], o de una inhibición de la ciclooxigenasa [423] o de la síntesis de TXB_2 , como se ha demostrado tras la administración a largo plazo de aceite de pescado [556].

Se puede plantear la hipótesis de que las primeras 3 semanas de dieta pudieran haber reducido algo la disponibilidad de sustrato (AA) a la semana 0 (inicio de la administración de aceite) en ambos grupos, dando valores de producción de HHT y 12-HETE relativamente inferiores a los basales; en el grupo tratado con aceite de oliva,

el suplemento de AA suministrado aumentaría la disponibilidad de sustrato de forma suficiente como para determinar un aumento aparente en la producción total de eicosanoides por las vías de la ciclooxigenasa y 12-lipoxigenasa plaquetar. En consecuencia, el descenso verdadero en los pacientes del grupo tratado con aceite de pescado (S8 respecto de S -3) podría ser aún mayor, aunque al no disponer de los valores correspondientes a la entrada en el protocolo (S -3) en todos los casos no se puede confirmar esta hipótesis.

Un parámetro esencial para confirmar o descartar la hipótesis de la sustitución de sustrato a nivel de la membrana celular, y que no pudo ser determinado en el presente estudio, es el contenido relativo en ácidos grasos (analizados mediante cromatografía de gases-líquidos de los correspondientes metilésteres) esterificados en las membranas celulares. Para evaluar la eficacia del tratamiento dietético en términos metabólicos se ha empleado la proporción de AA, EPA o DHA presentes en el plasma [445], o su incorporación relativa a los fosfolípidos del suero [442,447] o de la membrana celular en plaquetas [425,445,531], hematíes [531], PMN [442] o biopsias mediante queratoloma de placas de psoriasis [442]. El cociente EPA/AA plaquetar es un buen marcador de la composición de la dieta, siendo por lo general inferior a 0.1 en la población europea y pudiendo llegar a 7 en los esquimales [557].

En estudios de tratamiento de la psoriasis con aceite de pescado, la incorporación de EPA se ha empleado como marcador del cumplimiento de la prescripción [447], habiéndose demostrado útil la valoración del cociente EPA/AA en plaquetas [445] o el cociente EPA/DHA en PMN y biopsias de piel [442], cuyo aumento ha permitido identificar a aquellos pacientes que presentan respuesta clínica frente al tratamiento con aceite de pescado.

La disminución en la producción máxima de eicosanoides por las vías

de la ciclooxigenasa y 12-lipoxigenasa plaquetar en pacientes tratados con aceite de pescado también puede considerarse como la manifestación de una posible tendencia a la normalización de las alteraciones que se han descrito en el metabolismo del AA en las plaquetas de pacientes psoriásicos, con un aumento en la producción de 12-HETE y HHT, posiblemente a consecuencia de un aumento en la liberación del AA esterificado en la membrana plaquetar [290], y una mayor actividad de la ciclooxigenasa plaquetar [532,558] con respecto a los controles normales, que se podría correlacionar con la hiperagregabilidad plaquetar y la tendencia a los fenómenos trombóticos que se observan en los pacientes psoriásicos [290-292,532]. La disminución de la agregabilidad o actividad plaquetar por efecto del tratamiento dietético con EPA o DHA, que se ha observado en diversos estudios [425,429,530,531,339,559], podría tener implicaciones terapéuticas o profilácticas si se produjera (lo que no se ha confirmado [445]) en pacientes con psoriasis e hiperagregabilidad plaquetar. Se requieren estudios adicionales para confirmar esta posibilidad y evaluar la posible relación causal entre la modulación del metabolismo plaquetar del AA y el efecto antiagregante de la administración de aceite de pescado rico en EPA o DHA.

En cualquier caso, el estudio del metabolismo del AA endógeno en suspensiones de plaquetas parece ser prometedor como parámetro indicador de la eficacia a nivel metabólico del tratamiento dietético de la psoriasis con aceite de pescado, y merece ser objeto de ulteriores estudios.

En conclusión, el tratamiento dietético con aceite de pescado parece tener una eficacia demostrada en pacientes con psoriasis en placas crónica y de gravedad moderada. Sin embargo, deben efectuarse estudios adicionales para determinar la necesidad de una modificación dietética global así como la dosis eficaz de aceite de pescado, que probablemente deba ser superior al equivalente de

2.5 g/día de EPA. La presencia de grandes variaciones en cuanto al contenido de ácidos grasos de la serie ω -3 en diferentes productos e incluso lotes de una determinada marca comercial puede dificultar la dosificación. También será necesario establecer la duración idónea del tratamiento, puesto que no se puede determinar la eficacia del mismo hasta que no han transcurrido por lo menos 4 meses [448], y valorar su posible utilidad en formas de psoriasis con un mayor componente inflamatorio, tales como la psoriasis pustulosa, guttata y eritrodérmica, especialmente en pacientes en quienes estén contraindicados otros tratamientos sistémicos. Es muy posible que el aceite de pescado constituya un tratamiento coadyuvante ideal, puesto que se ha demostrado que aumenta la eficiencia de la fototerapia con UVB [529], disminuye el efecto hipertriglicéridemiante de los retinoides [542] y tiene una serie de efectos favorables sobre el perfil lipídico, la función plaquetar, la hipertensión arterial y otros factores de riesgo para la cardiopatía coronaria y la enfermedad tromboembólica [429], a la que podrían estar más expuestos los pacientes con psoriasis.

La eficacia del tratamiento con ácidos grasos ω -3 probablemente se podrá mejorar modificando globalmente la dieta de los pacientes con vistas a aumentar la ingesta de pescado azul y disminuir la ingesta de alimentos con un contenido elevado de AA. Es interesante tener en cuenta que el consumo diario de tan sólo unos 200 g de pescado azul (caballa, arenque) o salmón aporta una cantidad de ácidos grasos ω -3 equivalente a la suministrada al grupo de tratamiento en el presente estudio.

En el futuro será necesario efectuar estudios más amplios y extensos con vistas a establecer la posología idónea de los ácidos grasos ω -3 en diversos tipos de psoriasis, como tratamiento único o coadyuvante en la práctica dermatológica cotidiana, correlacionando la respuesta clínica con los parámetros bioquímicos idóneos y teniendo en cuenta la variabilidad interindividual en cuanto a

la biodisponibilidad de los ácidos grasos de la dieta y su destino metabólico final.